

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**



**FACOLTA' DI
SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI**

**TESI DI DOTTORATO
IN
BIOLOGIA APPLICATA**

*I geni $cotH$ e $cotG$ di *Bacillus subtilis*:
analisi trascrizionale e modello evolutivo*

Tutor
Prof. Loredana Baccigalupi

Dottoranda
Rosa Giglio

**ANNO ACCADEMICO 2010/2011
XXIII CICLO**

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1	<i>Bacillus subtilis</i>	pag. 1
1.2	Struttura della spora	pag. 2
1.3	Sporulazione e germinazione in <i>B. subtilis</i>	pag. 5
1.4	Fasi della sporulazione	pag. 10
1.5	Espressione genica durante la sporulazione	pag. 14
1.6	Sintesi e assemblaggio della tunica sporale	pag. 16
1.7	Controllo trascrizionale dei geni <i>cot</i>	pag. 19
1.8	Regolazione post-traduzionale dei geni <i>cot</i>	pag. 24
1.9	Modifiche post-traduzionali	pag. 30
1.10	Le proteine CotH e CotG	pag. 30
1.11	Scopo della tesi	Pag. 34

2. MATERIALI E METODI

2.1	Ceppi batterici	pag. 38
2.2	Terreni di coltura	pag. 39
2.3	Preparazione di cellule competenti e trasformazione di E.coli	pag. 41
2.4	Preparazione di cellule competenti e trasformazione di B.subtilis	pag. 42
2.5	Purificazione del DNA plasmidico su larga scala	pag. 43
2.6	Digestione enzimatica	pag. 44

2.7	Elettroforesi su gel di agarosio	pag. 44
2.8	Eluizione del DNA da gel di agarosio	pag. 45
2.9	Reazione di ligasi	pag. 45
2.10	Polymerase Chain Reaction (PCR)	pag. 45
2.11	Preparazione di DNA cromosomale	pag. 47
2.12	<i>Primer extension</i>	pag. 48
2.12.1	Estrazione degli mRNA	pag. 48
2.12.2	Trattamento con DNasi	pag. 49
2.12.3	Sintesi del cDNA	pag. 49
2.12.4	<i>Primer extension</i>	pag. 50
2.12.5	Marcatura terminale dell'oligonucleotide	pag. 51
2.12.6	Preparazione del DNA e reazioni di sequenza	pag. 52
2.12.7	Elettroforesi di DNA su gel di acrilammide	pag. 53
2.13	Tamponi di corsa per elettroforesi	pag. 53
2.14	Misura dell'attività β -galattosidasica	pag. 54
2.15	Induzione della sporulazione in <i>B. subtilis</i>	pag. 55
2.15.1	Purificazione delle spore mature	pag. 55
2.15.2	Lisi delle cellule in sporulazione mediante sonicazione	pag. 56
2.16	Estrazione delle proteine del rivestimento sporale	pag. 57
2.16.1	Estrazione con SDS	pag. 57
2.16.2	Estrazione alcalina	pag. 57
2.17	Determinazione della concentrazione proteica	pag. 58
2.18	Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)	pag. 59
2.19	Elettrotrasferimento di proteine e western blot	pag. 60

2.20	Colorazione di gel di poliacrilammide per Coomassie	pag. 61
2.21	Misura della resistenza al lisozima	pag. 61
2.22	Misura dell'efficienza di germinazione	pag.62

3. RISULTATI

3.1	Analisi dell'espressione del gene <i>cotH</i>	pag. 63
3.1.1	Analisi per delezione	pag. 67
3.1.2	Analisi della regione regolativa del gene <i>cotH</i>	pag.72
3.1.3	Analisi della sequenza a monte del gene <i>cotH</i>	pag. 76
3.1.4	Identificazione del sito d'inizio della trascrizione	pag. 77
3.1.5	Costruzione delle fusioni trascrizionali <i>cotH::lacZ</i> ed integrazione in <i>B.subtilis</i>	pag. 81
3.1.6	Analisi delle fusioni trascrizionali <i>cotH::lacZ</i>	pag. 86
3.2	Analisi della funzione della 5'UTR sulla traduzione della proteina CotH	pag. 88
3.2.1	Costruzione della delezione	pag. 91
3.2.2	Intgrazione in <i>B. subtilis</i>	pag. 94
3.2.3	Analisi strutturale delle spore mutanti <i>cotHΔ</i> mediante SDS_PAGE e <i>Western blot</i>	pag. 96
3.3	Analisi del locus <i>cotH/cotG</i>	pag.99
3.3.1	Struttura, origine ed evoluzione del gene <i>cotG</i>	pag. 106
3.4	Costruzione e analisi del mutante <i>cotG⁻</i>	pag. 117
3.4.1	Delezione del locus genico <i>cotG/cotH</i>	pag. 118

3.4.2	Costruzione del ceppo di <i>B.subtilis</i> doppio mutante <i>cotG</i> ⁻ / <i>cotH</i> ⁻ (G ⁻ H ⁻)	pag. 122
3.4.3	Costruzione dell'allele <i>cotGstop</i> mediante mutagenesi sito-specifica	pag. 124
3.4.4	Costruzione di un singolo mutante <i>cotG</i> ⁻ di <i>Bacillus subtilis</i> (G ⁻ H ⁺)	pag. 130
3.4.5	Costruzione dei ceppi di controllo G ⁺ H ⁺ e G ⁺ H ⁻	pag. 133
3.4.6	Analisi strutturale delle spore mutanti <i>cotG</i> ⁻ mediante SDS-PAGE e <i>western blot</i>	pag. 138
3.4.7	Analisi delle proteine della tunica per SDS-PAGE	pag. 141
3.4.8	<i>Western blot</i> anti-CotH	pag. 143
3.4.9	<i>Western blot</i> anti-CotB	pag. 146
3.5	Analisi dell'assemblaggio di CotC	pag. 149
3.5.1	Analisi dell'assemblaggio di CotC e CotU	pag. 151
3.6	Analisi fisiologica dei mutanti	pag. 156
3.6.1	Saggio di resistenza al lisozima	pag. 156
3.6.2	Saggio di germinazione	pag. 156

4. DISCUSSIONE pag. 162

5. BIBLIOGRAFIA pag. 172

1. Introduzione

1.1 *Bacillus subtilis*

I batteri appartenenti al genere *Bacillus* sono organismi Gram positivi sporigeni, cioè caratterizzati dalla capacità di formare endospore (spore). *Bacillus subtilis* è considerato GRAS (Generally Recognized as Safe) cioè non nocivo per l'uomo e il processo di sporulazione rappresenta un importante sistema modello per lo studio dell'espressione genica e del differenziamento cellulare.

Dalla seconda metà del XX secolo ceppi della specie naturalmente competente *Bacillus subtilis* sono stati utilizzati per lo studio biochimico e genetico del metabolismo primario e secondario, della fase di competenza, del processo di formazione della spora e della sua successiva riconversione in cellula vegetativa (germinazione). Tali studi hanno portato la conoscenza del metabolismo, della genetica e della fisiologia di *B. subtilis* a un livello di approfondimento paragonabile solo a quello raggiunto con *Escherichia coli*, il principale sistema modello microbico.

Nel 1997, con la conclusione del sequenziamento dell'intero genoma di *B. subtilis* (Kunst, *et al.*, 1997), è iniziata una nuova fase dello studio di tale organismo. Le analisi bioinformatiche dei

genomi microbici disponibili, l'analisi funzionale dei molti geni non noti, la possibilità di analizzare l'espressione genica globalmente con *microarrays* e la possibilità di analisi proteomica, rendono ora più accessibile lo studio di complesse vie metaboliche spesso interconnesse tra loro e di problemi biologici di base sull'organizzazione intracellulare, sull'organizzazione di strutture sub-cellulari e sui segnali molecolari a cui le cellule rispondono per adattarsi a repentine variazioni ambientali.

1.2 Struttura della spora

La spora è una forma cellulare metabolicamente quiescente che si forma all'interno di una cellula vegetativa in risposta a condizioni ambientali sfavorevoli, come ad esempio la mancanza di nutrienti.

La spora, una volta formata, può rimanere in uno stato inerte per un periodo indefinito, conservando la capacità di monitorare l'ambiente e di germinare quando si ripresentano condizioni favorevoli, dando origine a cellule vegetative capaci di crescere e duplicarsi.

La resistenza della spora a condizioni ambientali estreme, generalmente letali per la cellula vegetativa, è dovuta in parte al

loro strato di rivestimento esterno di natura proteica, la tunica sporale. La formazione di tale struttura avviene mediante un complesso programma di differenziamento cellulare regolato da un sofisticato circuito regolativo che determina la sintesi dei componenti strutturali e regolativi.

In *B. subtilis* è necessaria l'espressione di oltre 100 geni per portare a termine il processo di formazione della spora (sporulazione) (Stragier and Losick, 1996). La resistenza della spora a condizioni ambientali estreme (temperatura, pH, esposizione a raggi UV e sostanze chimiche tossiche), generalmente letali per la cellula vegetativa, è dovuta ad alcune caratteristiche strutture sub-cellulari come lo spesso strato corticale (*cortex*), una forma modificata di peptidoglicano, e la tunica sporale (*coat*), un doppio strato proteico che circonda il cortex (Stragier and Losick, 1996; Driks, 2002), (Figura 1).

Il grado di disidratazione del citoplasma della spora e la presenza di un'abbondante famiglia di proteine, le *Small Acid-Soluble Proteins* (SASP), che legano in modo aspecifico il DNA, contribuiscono inoltre a proteggere rispettivamente le strutture

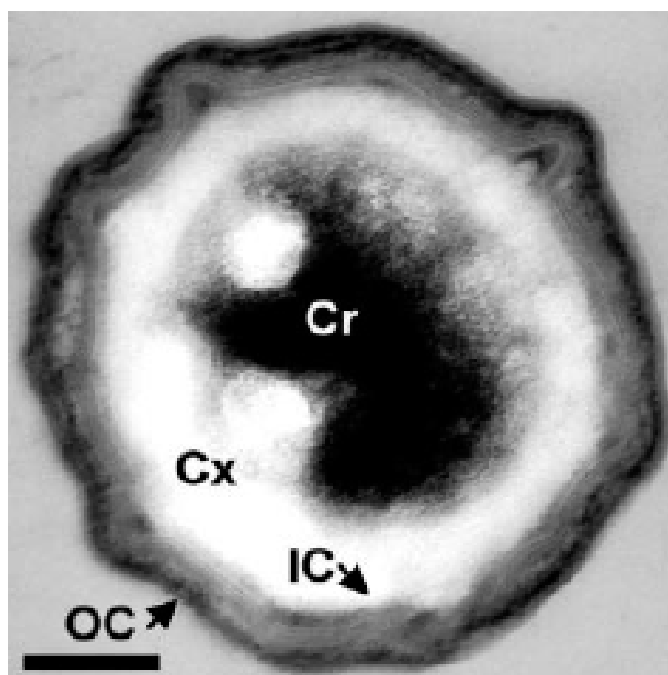


Figura 1: fotografia al microscopio elettronico di una spora di *Bacillus subtilis*. Cr indica il core della spora; Cx la corteccia; IC e OC lo strato interno ed esterno della tunica, rispettivamente (Silvaggi *et al.*; 2004).

citoplasmatiche ed il cromosoma e sono essenziali nel determinare lo stato metabolicamente quiescente della spora (Driks, 2002).

La formazione della spora all'interno di una cellula vegetativa è un processo complesso che in condizioni di laboratorio si completa in 8-10 ore e che avviene secondo una precisa serie di modificazioni morfologiche. Tali eventi morfologici sono la conseguenza di un programma di espressione genica differenziato nel tempo e specificamente distinto tra la cellula vegetativa, in cui la spora si sta formando, e la spora in formazione (Stragier and Losick, 1996).

1.3 Sporulazione e germinazione in *B. subtilis*

I batteri sporigeni sono caratterizzati dalla capacità di seguire due cicli vitali diversi ed alternativi tra loro. Finché le cellule si trovano in condizioni ambientali ottimali per la crescita microbica (presenza di acqua e nutrienti, temperatura e pH ottimali) questi organismi seguono un ciclo vitale detto "vegetativo", identico a quello che si osserva per i batteri non sporigeni. In tale ciclo una cellula si accresce, replica il suo cromosoma e quindi si divide in modo simmetrico originando due cellule identiche tra loro e alla

cellula madre che le ha originate. Quando le condizioni ambientali non sono ottimali per la crescita microbica, i batteri sporigeni seguono invece un ciclo vitale alternativo, detto "sporulazione".

In tale ciclo vitale, come descritto in dettaglio di seguito, dopo la replicazione del cromosoma avviene una divisione cellulare asimmetrica che forma due cellule disuguali, una piccola detta prespora ed una più grande, detta cellula madre. Queste due cellule hanno identico patrimonio genetico ma morfologia, metabolismo e destini diversi, giacché la prespora originerà la spora matura che sarà rilasciata nell'ambiente, mentre, la cellula madre parteciperà alla maturazione della spora e liserà alla fine del processo.

La spora può rimanere in uno stato inerte per un tempo anche molto lungo (centinaia di anni) ma al ripristinarsi di condizioni ambientali opportune è in grado di "germinare", cioè di re-idratarsi, riattivare il proprio metabolismo e trasformarsi in cellula vegetativa, in grado di crescere in modo vegetativo ed eventualmente di ri-sporulare.

La diversità morfologica e metabolica tra due cellule geneticamente identiche è resa possibile dal fatto che ciascuna delle due cellule segue un diverso programma di espressione genica. Nei batteri sporigeni ciò è reso possibile da una cascata di quattro fattori σ dell'

RNA polimerasi, alternativi al fattore σ^A attivo durante la crescita vegetativa.

Tali fattori entrano in gioco nell'ordine: σ^F , σ^E , σ^G e σ^K e, conferendo una specificità di riconoscimento alla RNA polimerasi, controllano la trascrizione di centinaia di geni, detti geni *spo*, non espressi durante il ciclo di crescita vegetativo (Stragier and Losick, 1992).

L'intero processo di sporulazione può essere diviso in VII stadi, (schematizzati in figura 2) ognuno dei quali è caratterizzato a livello genetico, dall'espressione di uno specifico sotto-gruppo di geni *spo*, e a livello morfologico, da specifiche modifiche strutturali. Tale suddivisione non è però rigida in quanto diversi fenomeni si svolgono nel corso di più fasi. Un esempio a tale proposito è rappresentato dall'elevato livello di disidratazione della spora matura che è raggiunto gradualmente durante l'intero processo di sporulazione.

Al ripristinarsi delle condizioni ambientali favorevoli la spora germina, dando origine a una cellula metabolicamente attiva.

Induzione della germinazione ed esocrescita sono le due fasi che

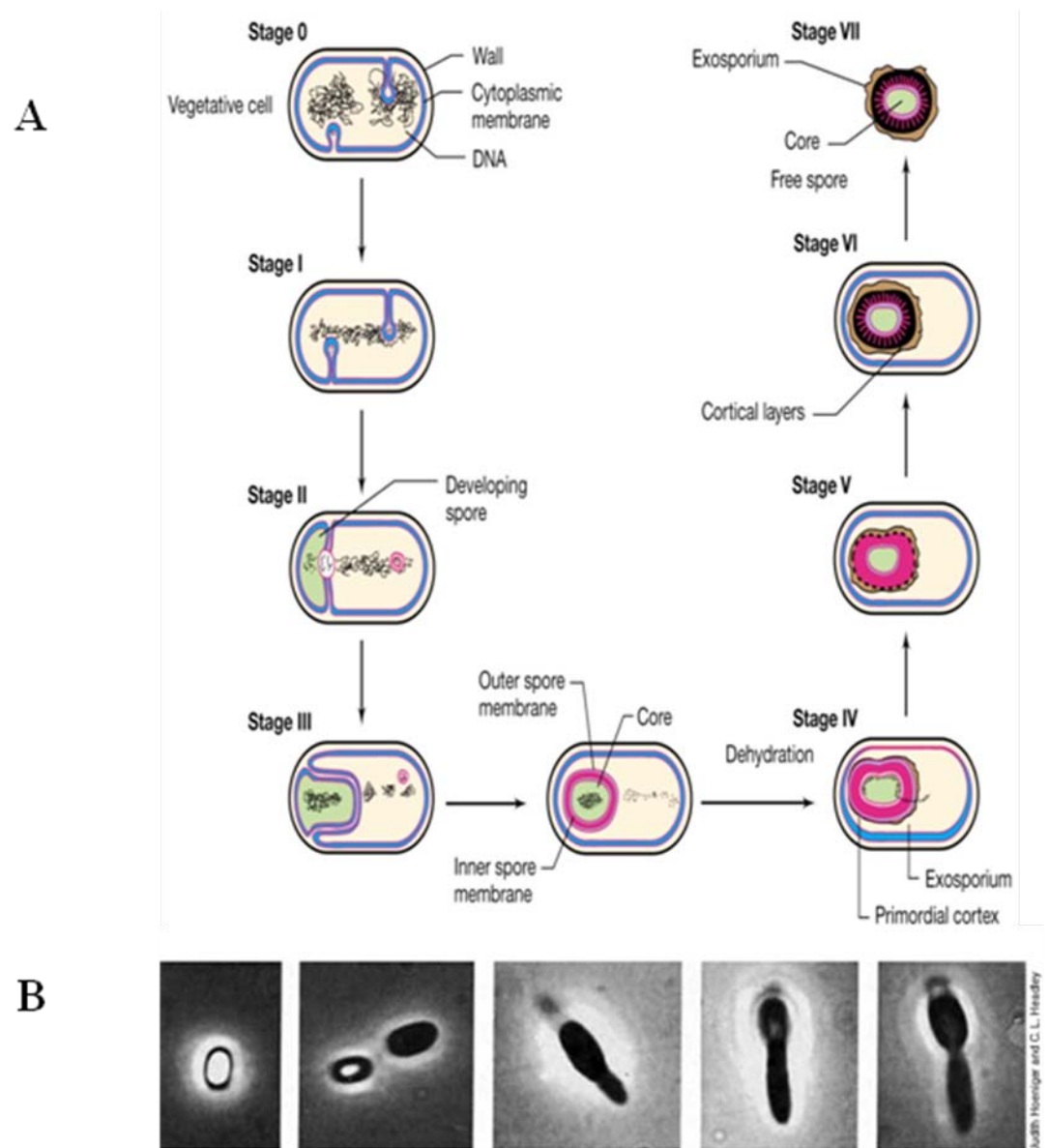


Figura 2: **A)** Rappresentazione schematica dei vari stadi della sporulazione in *B. subtilis*. **B)** Fotografie al microscopio ottico che riproducono le varie fasi della germinazione.

una spora deve superare per ritornare alla condizione di cellula vegetativa. Come il processo di sporulazione, anche la germinazione é un processo irreversibile (Parker *et al.*; 1996).

Gli eventi morfologici e biochimici che caratterizzano il ritorno alla fase di crescita vegetativa sono: a) la reidratazione del citoplasma con il conseguente rigonfiamento della spora; b) la degradazione delle proteine strutturali della tunica sporale, che fa apparire le spore scure e non più rifrangenti al microscopio ottico, e delle proteine SASP; c) la scomparsa della resistenza al calore e agli altri agenti dannosi per la cellula.

In condizioni di laboratorio, la germinazione può essere indotta esponendo le spore a sostanze come la L-alanina o ad una miscela di asparagina, glucosio, fruttosio e KCl (AGFK). Sono state identificate varie classi di mutanti incapaci di germinare o capaci di germinare, ma più lentamente, in presenza di L-alanina (*gerA*, *gerC* e *CotT*) o di AGFK (*gerB*, *gerK* e *fruB*). La diversità dei fenotipi ottenuti suggerisce che la spora sia dotata di sistemi distinti per il riconoscimento di stimoli germinativi diversi (Moir and Smith, 1990).

L'esocrescita é il processo di cambiamento morfologico e fisiologico che trasforma le spore germinanti in bacilli vegetativi. Mentre la germinazione é un processo rapido che impiega meno di un minuto per completarsi, il primo evento della fase di esocrescita, e cioè la scissione binaria di una cellula in due cellule figlie identiche, richiede più di un'ora.

La maggior parte degli aminoacidi utilizzati in questa fase d'intensa sintesi proteica è fornita al batterio dalla rapida degradazione delle proteine strutturali della tunica e delle SASP che rivestivano le une la superficie della spora e le altre il suo cromosoma.

1.4 Fasi della sporulazione

La formazione delle spore è distinta in una serie di fasi morfologiche che possono essere osservate con l'utilizzo del microscopio sia ottico sia elettronico. Una volta iniziato il processo, questo richiede circa 8 ore per completarsi in condizione di laboratorio. Il processo morfologico della

sporulazione è guidato da un programma di espressione genica controllato spazialmente e temporalmente (figura 2):

Stadio 0: trasduzione all'interno della cellula dei vari segnali esterni ed interni che inducono l'inizio della sporulazione, culminanti con l'attivazione del regolatore trascrizionale Spo0A.

Il controllo dell'inizio della sporulazione è affidato ad un sistema di fosforilazione a cascata, detto *multicomponent phosphorelay*, costituito da proteine con attività chinasi e fosfatasi capaci di modulare i vari segnali cellulari ed extracellulari.

Stadio II: comparsa di un setto di divisione cellulare situato in posizione asimmetrica che divide la cellula (denominata da questa fase in poi sporangio) in compartimenti disuguali, uno più grande, la cellula madre, e uno più piccolo, la prespora. Questa prima modificazione morfologica interrompe lo stato vegetativo della cellula ed è il primo evento irreversibile della sporulazione. Dopo la formazione del setto si ha l'attivazione del primo dei quattro fattori σ specifici della sporulazione, σ^F .

Stadio III: attivazione del fattore σ^E nel solo compartimento della cellula madre. Sotto l'azione regolativa di σ^E e σ^F si ha la degradazione della porzione peptidoglicaica del setto

asimmetrico a partire dai poli, il rigonfiamento del compartimento della prespora e la migrazione del setto membranoso che ingloba la prespora avvolgendola con una doppia membrana completa facendole assumere l'aspetto di un protoplasto libero all'interno della cellula madre. Dopo l'inglobamento della prespora nel citoplasma della cellula madre si osserva l'attivazione del terzo fattore sigma specifico della sporulazione, σ^G .

Stadio IV: sintesi di uno strato di peptidoglicano, chimicamente diverso da quello della parete cellulare, nel compartimento della cellula madre tra le due membrane esterne ed interne. L'acido dipicolinico (DPA), sintetizzato nella cellula madre, è trasportato nel compartimento della prespora dove si accumula come sale di calcio con la funzione di stabilizzare gli acidi nucleici sporali e contribuire alla disidratazione ed all'acquisizione della termoresistenza sporale. Sono sintetizzate, anche proteine a basso peso molecolare, dette SAPS che interagiscono con il cromosoma della spora proteggendolo dai raggi UV.

Stadio V: si attiva l'ultimo fattore sigma specifico della sporulazione, σ^K , nel compartimento della cellula madre. Lo strato proteico della tunica sporale, la cui sintesi comincia negli stadi

precedenti ma che raggiunge la sua completa formazione nello stadio V, viene depositato sulla superficie della spora. I geni che codificano per le proteine strutturali della tunica sporale sono tutti trascritti nella cellula madre sotto il controllo del fattore σ^K e del fattore trascrizionale GerE.

Stadio VI e VII: Gli stadi VI e VII del processo di formazione della spora sono caratterizzati da piccoli cambiamenti morfologici e dall'acquisizione, in sequenza, delle proprietà di resistenza e quiescenza e dalla capacità di germinare (stadio VI). Il rilascio della spora matura, in seguito alla lisi della parete cellulare della cellula madre caratterizza, invece, lo stadio VII.

La resistenza al calore, alle radiazioni, ai solventi organici e al lisozima (conferita molto probabilmente dall'azione di una serie di proteasi che contribuiscono alla formazione della tunica sporale), sebbene siano acquisite dalla spora nel corso dell'intero processo di sporulazione, sono osservabili e misurabili solo a partire dallo stadio VI.

1.5 Espressione genica durante la sporulazione

Nel corso delle varie fasi della sporulazione si osserva l'attivazione a cascata dei quattro fattori sigma dell'RNA polimerasi necessari per la trascrizione dei geni *spo*. La comparsa differenziata nel tempo di fattori sigma alternativi conferisce una diversa specificità all'RNA polimerasi e consente l'espressione coordinata di geni che vengono espressi soltanto dopo che il processo di sporulazione è stato indotto. Come schematicamente riportato in figura 3, due di questi fattori sigma sono specificamente espressi nella prespora (σ^F e σ^G) e due nella cellula madre (σ^E e σ^K), permettendo quindi di distinguere l'espressione genica delle due cellule. L'espressione genica nelle due cellule è però coordinata grazie alla presenza di punti di controllo (*checkpoints*) che permettono di associare lo sviluppo morfologico di una cellula all'espressione genica dell'altra. Secondo questo modello, detto *criss-cross*, σ^F nella prespora codifica per σ^G , ma determina l'attivazione di σ^E nella cellula madre. Così σ^E , una volta attivato, codifica per σ^K nella cellula madre, ma determina l'attivazione di σ^G nella prespora. Infine σ^G nella prespora media l'attivazione di σ^K nella cellula madre.

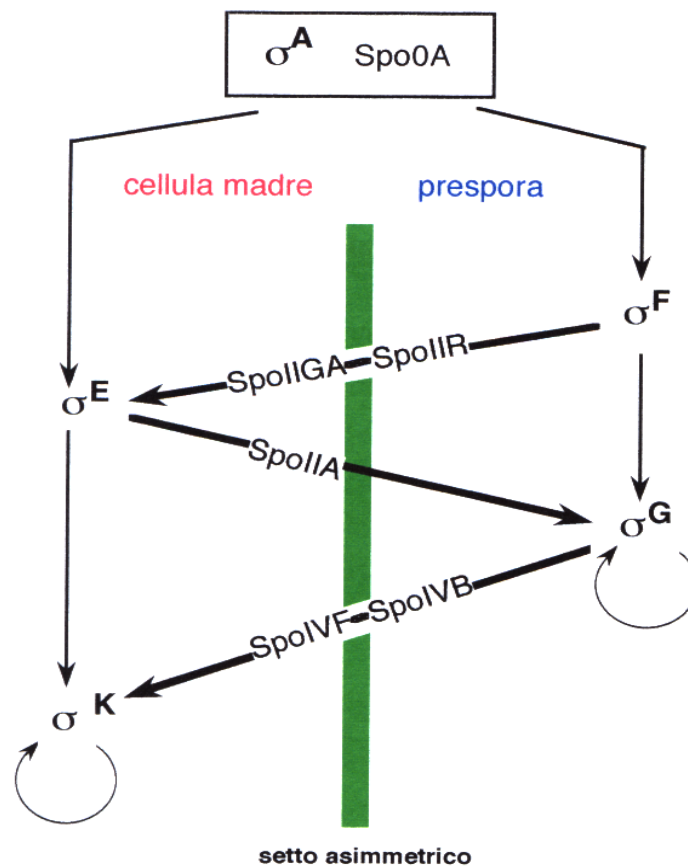


Figura 3: Meccanismo di regolazione (*criss-cross*) della sporulazione. Le frecce sottili indicano il controllo trascrizionale nelle due cellule, quelle spesse i tre *checkpoints* che coordinano l'espressione genica di una cellula con lo sviluppo morfologico dell'altra.

Il modello *criss-cross*, proposto nel 1992 (Stragier and Losick), è stato confermato da una serie di evidenze sperimentali basate su esperimenti di microscopia elettronica ed a fluorescenza, dati biochimici e genetici

1.6 Sintesi e assemblaggio della tunica sporale

La tunica è divisa in due strati: interno ed esterno. Quello interno, con uno spessore tra i 20 e i 40nm, è formato dalla giustapposizione di un numero di lamine compreso tra tre e cinque; quello esterno, con uno spessore tra 40 e 90nm, risulta denso agli elettroni (Henriques and Moran, 2004). Entrambi gli strati sono necessari per conferire alla spora le sue caratteristiche di resistenza e per consentirle un'ottimale germinazione (Ricca *et al.*, 1997). Osservazioni al microscopio elettronico dello sporangio durante le prime fasi di formazione della tunica hanno rivelato che tale processo inizia con l'assemblaggio, ad entrambi i poli della spora, di proteine sia dello strato interno che di quello esterno, dando origine a due strutture a forma di cappuccio, che gradualmente finiscono per circondare l'intera spora. Probabilmente come conseguenza del meccanismo polare d'assemblaggio, si osserva che nella spora matura lo spessore

della tunica é maggiore ai due poli rispetto alle zone mediane (Mckenney, Driks *et al.*; 2010).

In *B. subtilis* si osserva una tunica di struttura complessa ed eterogenea, ottenuta dall'interazione tra circa settanta polipeptidi diversi, molti dei quali sono capaci di legare altri componenti della tunica, mediante interazioni ad alta o bassa specificità non ancora caratterizzate. In figura 4 è riportato uno schema recentemente proposto (Kim *et al.*, 2006) che riassume i dati ad oggi disponibili relativi alle interazioni che sono state identificate tra i diversi componenti della tunica. Nella maggioranza dei casi tali interazioni sono dedotte sulla base della dipendenza dell'assemblaggio di un componente dalla presenza di un altro componente e non sono noti i dettagli biochimici dell'interazione stessa.

Alcuni di tali geni, come *cotJABC* (Henriques *et al.*, 1995), *cotVWX* e *cotYZ* (Zhang *et al.*, 1994) sono raggruppati a formare operoni mentre altri, come *cotB* (Donovan *et al.*, 1987), *cotG* (Sacco *et al.*, 1995) e *cotH* (Naclerio *et al.*, 1996), sebbene adiacenti sul cromosoma, formano unità trascrizionali indipendenti.

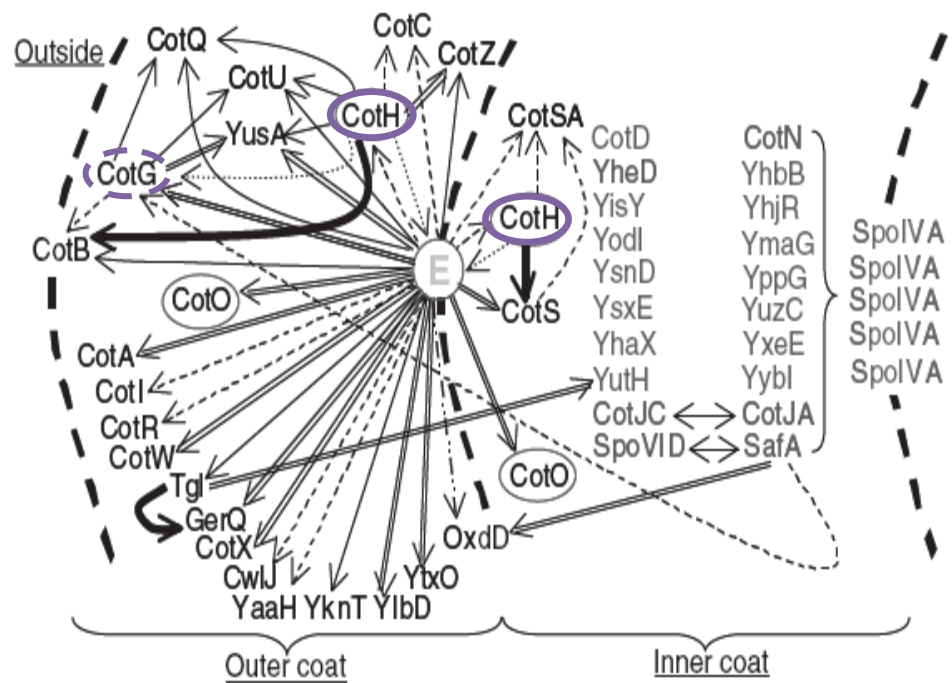


Figura 4: modello del network di interazioni tra le proteine della tunica sporale (Kim *et al.*, 2006).

Un'accurata analisi della localizzazione delle proteine dello strato interno ed esterno e del loro tempo di comparsa, hanno indicato che l'assemblaggio degli strati della tunica non avviene in stadi sequenziali dall'interno all'esterno. Infatti, i componenti dello strato interno della tunica non sono sintetizzati prima dei componenti di quello esterno. La corretta formazione della tunica sporale appare, invece, controllata da un complesso meccanismo regolativo che agisce a due livelli, uno trascrizionale, che controlla la sintesi temporalmente differenziata dei componenti della tunica, ed uno post-traduzionale, che controlla l'assemblaggio e le modifiche dei vari componenti strutturali (Driks *et al.*, 1994; Ricca *et al.*, 1997).

1.7 Controllo trascrizionale dei geni *cot*

L'espressione dei geni della tunica inizia subito dopo la divisione asimmetrica e coinvolge almeno cinque fattori trascrizionali, che agiscono esclusivamente a livello della cellula madre. Tali fattori comprendono oltre a σ^E e σ^K , già nominati in precedenza, anche delle *DNA-binding proteins*, dette SpoIIID, GerE e GerR che

modulano l'espressione genica fungendo a volte da attivatori ed a volte da repressori della trascrizione.

L'attivazione di ognuno di questi fattori, è legata ad uno specifico stadio di sporulazione, di modo che l'espressione di ogni gene è associata al cambiamento morfologico della cellula.

In base ai fattori trascrizionali richiesti per la loro espressione si possono distinguere quattro classi sequenziali di geni *cot* (Figura 5). Il programma genetico della cellula madre coinvolge l'attivazione di 383 geni, che rappresentano circa il 9% dei geni del genoma di *B. subtilis*, e comincia dall'attivazione del fattore σ^E a partire dalla sua forma inattiva ($\text{pro-}\sigma^E$). Tra i geni che σ^E controlla ci sono *spoIVA*, *spoIVD* e *cotE* che codificano per proteine ad azione morfogenetica importanti per l'assemblaggio dei vari componenti della tunica sporale. Il fattore σ^E guida anche l'espressione dei geni *spoIIID* e *gerR* codificanti per fattori trascrizionali che influenzano l'attività dell'RNA polimerasi fungendo da attivatori o da repressori della trascrizione. In particolare SpoIIID agisce regolando l'espressione di geni σ^E -dipendenti che vanno a costituire i geni di classe II.

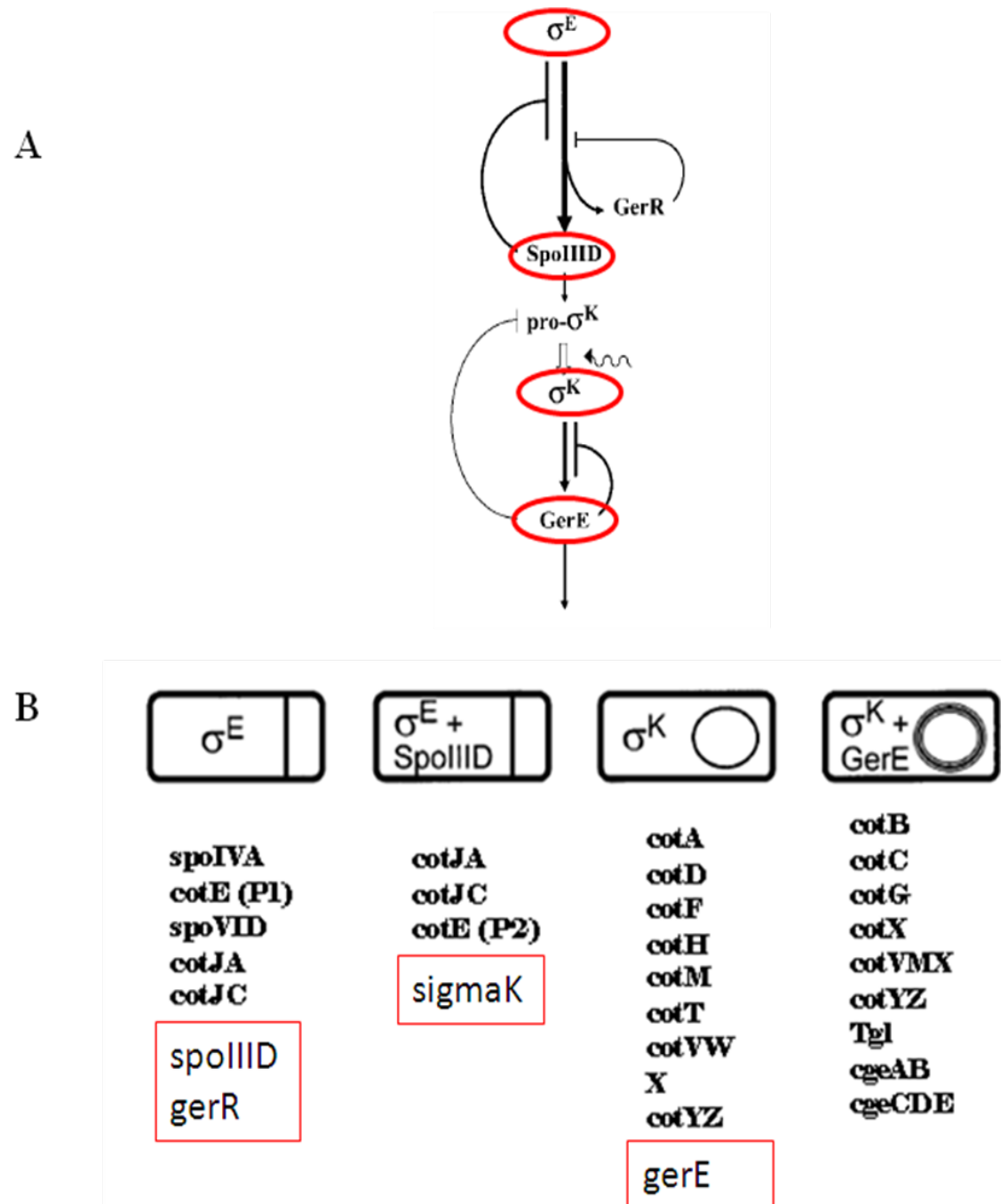


Figura 5: **A)** cascata regolativa determinata dall'intervento di diversi fattori trascrizionali; **B)** elenco dei geni *cot* appartenenti alle quattro classi di espressione.

Tra questi c'è ancora una volta il gene *cotE* che è caratterizzato dalla presenza di due promotori diversi, il primo dipendente da σ^E ed il secondo dipendente da σ^E +SpoIIID. Tale sistema assicura che l'espressione della proteina CotE sia prolungata nel tempo, condizione importante per garantire il corretto assemblaggio della tunica sporale. Il regolatore GerR funge principalmente da repressore trascrizionale di geni appartenenti a diverse classi trascrizionali (Cangiano et. al 2010; Eichenberger *et al.* 2010).

Nella fase successiva, il fattore σ^E con l'ausilio del fattore SpoIIID, attiva la trascrizione del gene *sigK* codificante la forma inattiva del fattore σ^K (pro- σ^K).

L'attivazione di σ^K è rinviata al completamento della fase d'ingolfamento, durante la quale la prespora è convertita in un protoplasto libero all'interno del citoplasma della cellula madre.

In questa fase nella prespora viene attivato il fattore σ^G responsabile dell'espressione di geni codificanti per proteine che mediante un taglio proteolitico, convertono pro- σ^K nella sua forma matura. Vengono così espressi i geni di classe 3 in maggioranza codificanti per proteine strutturali della tunica sporale quali: *cotA*, *cotD*, *cotH*, *cotF*, *cotT*, *cotV*, *cotW*, *cotY*, *cotZ*

e *cotM*. Inoltre σ^K dirige la trascrizione del gene *gerE*, codificante per un regolatore trascrizionale che insieme con σ^K , attiva l'espressione dell'ultima classe di geni *cot*. Le trascizioni GerE-dipendenti comprendono i geni *cotB*, *cotC*, *cotS*, *cotG*, *cotU*, *cotVMX*, *tgl*, *cotYZ* e *cotX*. Ceppi con mutazioni non senso in *gerE* mostrano un'alterata espressione di numerosi geni della cellula madre e producono spore mancanti dello strato interno della tunica sporale, poco resistenti ad agenti chimici ed enzimi, e difettive negli ultimi stadi della germinazione (Moir, 1981; Henriques and Moran, 2000; Driks, 2002).

Questi meccanismi consentono un'accurata regolazione temporale della sintesi dei vari componenti della tunica sporale essenziale per un suo corretto assemblaggio. Mutanti in cui il tempo di attivazione del fattore σ^E é alterato e che, di conseguenza, sintetizzano i componenti della tunica di classe III e IV in anticipo, producono spore incapaci di germinare efficientemente (Cutting *et al.*, 1991; Ricca *et al.*, 1992).

Da tali evidenze si conclude che tutti i geni coinvolti nell'assemblaggio della tunica sporale sono trascritti nel compartimento della cellula madre, subito dopo la divisione

asimmetrica, e solo successivamente i prodotti vengono assemblati per formare la tunica (Henriques and Moran, 2000).

1.8 Regolazione post-traduzionale dei geni *cot*

Il meccanismo di regolazione dell'espressione genica, descritto nel paragrafo precedente, assicura che il prodotto proteico giusto sia disponibile al momento e nelle quantità opportune. Ma questo meccanismo da solo non può garantire che tutti i singoli componenti della tunica sporale vengano guidati esattamente nella corretta posizione nella spora matura. Tale compito è svolto da una serie di proteine ad attività morfogenetica facenti parte della tunica sporale o associate transitoriamente ad essa (Henrique *et al.*; 2007).

L'attività di queste proteine rappresenta il secondo livello di regolazione nella formazione della tunica che agisce post-traduzionale, grazie all'intervento di almeno quattro proteine ad azione morfogenetica, SpoIVA, CotE, SafA e SpoVID (McKenney *et al.*, 2010). Secondo il modello schematizzato in figura 6 (Henrique *et al.*; 2007), la proteina SpoIVA (Roels, S., A. Driks, and R. Losick. 1992.) è assemblata alla base della tunica e la sua

localizzazione è garantita dall'intervento da un piccolo peptide anfipatico SpoVM, localizzato nella membrana esterna della prespora. Attraverso la sua estremità C-terminale interagisce con SpoIVA ancorandola sulla membrana esterna (Ramamurthi et al.; 2006).

Ceppi mutanti che non producono SpoIVA formano una tunica bistratificata di aspetto normale, ma dispersa nel citoplasma e non localizzata sulla superficie esterna della prespora (Roels *et al.*, 1992; Stevens *et al.*, 1992).

Successivamente interviene la proteina CotE che svolge un ruolo chiave nella formazione dello strato esterno della tunica sporale (Little and Driks 2001). Spore mutanti in *cotE* mancano completamente dello strato esterno. Secondo il modello attualmente proposto CotE è in grado di formare multimeri (Krajčíková *et al.*; 2009) che formano un anello che circonda l'involucro di SpoIVA posizionandosi ad una certa distanza da esso (Zheng, *et al.*, 1988). È stato proposto che lo spazio che si viene a creare tra la prespora e le molecole di CotE sia occupato da una struttura tipo *scaffold*, a livello della quale verranno

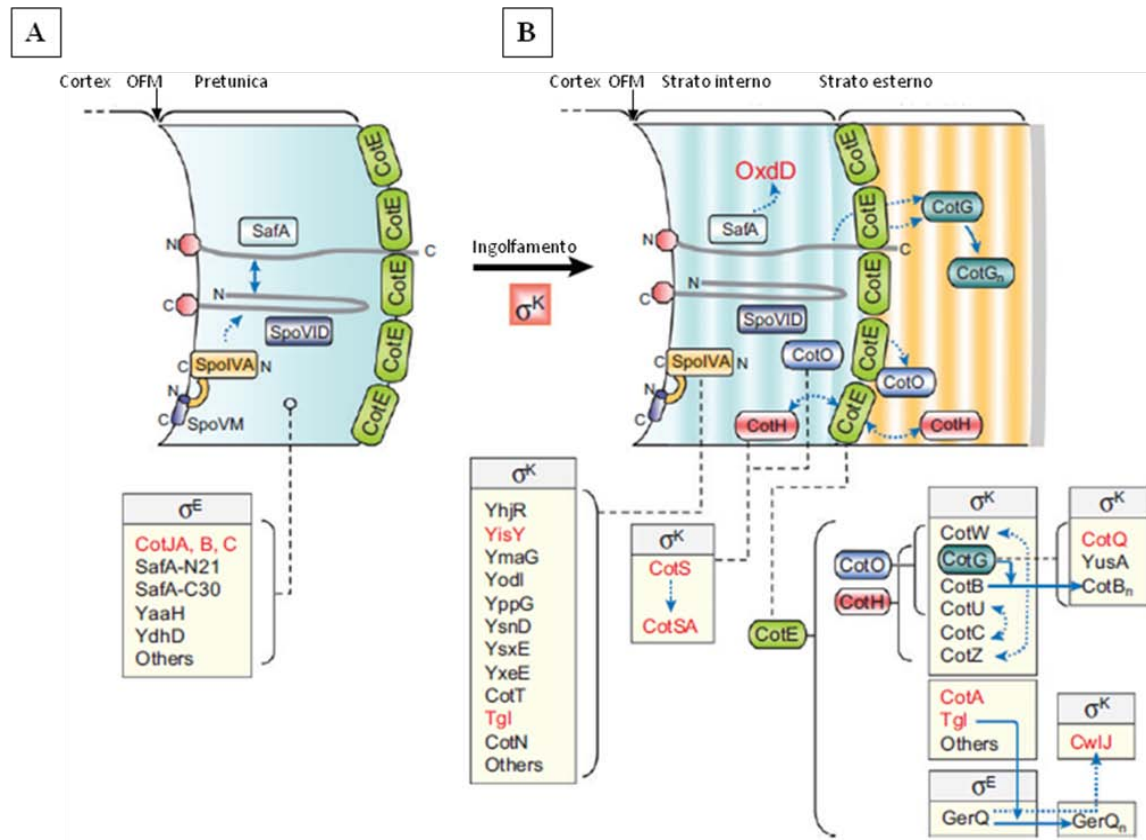


Figura 6: Modello dell'assemblaggio della tunica sporale di *B. subtilis*. **A)** Durante le fasi iniziali dell'assemblaggio della tunica le proteine sono localizzate vicino alla membrana esterna della prespora (OFM) e CotE è localizzata al margine della regione della pre-tunica. **B)** L'assemblaggio dello strato interno ed esterno della spora, si attua in seguito all'ingolfamento e all'attivazione di σ^K . Le proteine morfogenetiche sono evidenziate nei rettangoli colorati, mentre gli enzimi sono evidenziate in rosso.

assemblati i polipeptidi dello strato interno della tunica (Driks et al., 1994), mentre, all'esterno di CotE, si posizionano le proteine dello strato esterno.

Un ruolo simile a quello di CotE è stato proposto per la proteina SafA che è localizzata nella corteccia e avrebbe un ruolo chiave nel garantire l'assemblaggio dei componenti dello strato più interno della tunica (Ozin, A.J., *et al.*; 2000). La capacità di SafA e CotE di interagire con la maggior parte dei componenti della tunica è stata valutata attraverso lo studio di ceppi ricombinanti di *B. subtilis*, recanti fusioni geniche tra diversi geni *cot* ed il gene *gfp* codificante per l'omonima proteina fluorescente.

La proteina SpoVID svolge anch'essa un ruolo morfogenetico sulla formazione della tunica sporale con un'azione simile a quella di SpoIVA. Infatti, mutanti che non sintetizzano SpoVID producono una tunica non assemblata intorno alla prespora (Beall *et al.*, 1993). SpoVID quindi manterrebbe CotE nella giusta posizione nelle fasi finali della formazione della tunica, quando SpoIVA non è più attiva (Driks *et al.*, 1994).

Altre proteine ad azione morfogenetica sono CotH e CotG. CotH è un polipeptide di 43 kDa e svolge la sua funzione regolativa nel

controllare l'assemblaggio di almeno altri 9 componenti dello strato esterno, compreso CotG (Kim *et al.*; 2006). Mutanti nel suo gene strutturale presentano spore con profonde alterazioni nel profilo delle proteine Cot rilasciate dalla tunica di spore mature. Tali alterazioni si manifestano a livello morfologico nella formazione di spore con una tunica fortemente danneggiata sia nello strato interno che esterno (figura 7). Studi recenti effettuati nel laboratorio in cui ho svolto la tesi di dottorato, hanno permesso di proporre per CotH un ruolo di *chaperone* in grado di stabilizzare le proteine CotC e CotG, e di controllarne l'assemblaggio a livello della tunica (Baccigalupi *et al.*, 2004; Isticato *et al.*, 2004). Anche CotG svolge un ruolo regolativo, in quanto consente la maturazione del polipeptide CotB dalla forma di 46 KDa alla forma matura di 66 KDa che si trova sulla spora (Zilhao *et al.*, 2004).

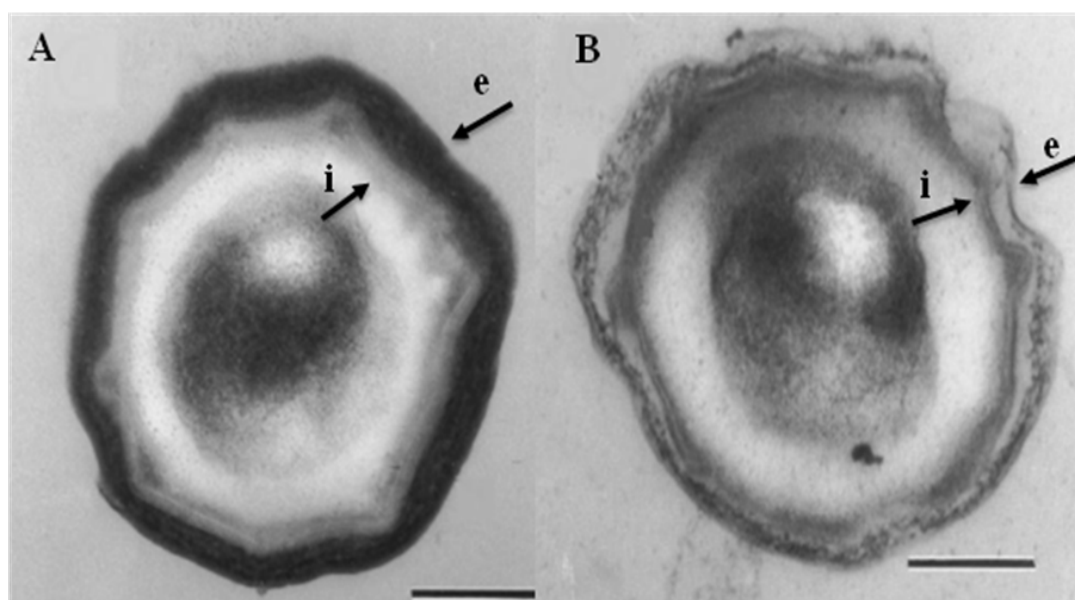


Figura 7: fotografie al microscopio elettronico di spore di un ceppo selvatico (**A**) e di un mutante *cotH* (**B**). Le frecce indicano lo strato esterno (e) e lo strato interno (i) della tunica sporale.

1.9 Modifiche post-traduzionali

La maturazione della tunica sporale necessita anche di una serie di modifiche post-traduzionali che avvengono a livello di alcuni componenti dopo la fase di assemblaggio. Un esempio è rappresentato dai numerosi eventi di *crosslink,s* quali la formazione di ponti disolfuro e ponti di tirosina, che contribuiscono alla stabilità della tunica sporale. Una delle proteine che potrebbe essere implicata nelle formazioni di tali legami è CotE a cui è stata associata una modesta attività perossidasi che potrebbe contribuire alla formazione dei ponti ditirosina. Altre modificazioni che avvengono a livello delle proteine sporali sono le glicosilazioni e le transglutaminazioni. Inoltre diverse proteine sono maturate mediante tagli proteolitici ma non sono state ancora identificate le proteasi responsabili.

1.10 Le proteine CotH e CotG

Tra le proteine ad azione morfogenetica che, intervengono nell'assemblaggio di altri componenti della tunica, ci sono CotH e CotG. I due geni strutturali mappano nella stessa regione cromosomica formando un cluster genico insieme a cotB

codificante per un'altro componente sporale (figura 8). I geni *cotG* e *cotH* sono trascritti in maniera divergente (Naclerio *et al.*, 1996) grazie al fattore σ^K dell'RNA polimerasi e sono espressi in maniera differenziata nel tempo grazie all'intervento del regolatore trascrizionale GerE, che agisce da repressore di *cotH* e da attivatore di *cotG* (Baccigalupi *et al.*, 2004).

Il gene *cotG* codifica per una proteina di 24kDa che migra su un gel di SDS PAGE come una proteina di 36 kDa. Tale discrepanza è stata associata alla presenza di nove ripetizioni in tandem di 13 aminoacidi (Sacco *et al.*; 1995) contenenti una elevata percentuale di aminoacidi carichi tra cui in particolare la lisina (28%).

Il gene *cotH* codifica per una proteina di 42,8 kDa, situata probabilmente all'interfaccia tra lo strato interno ed esterno della tunica. Mutanti che non esprimono il gene *cotH* presentano chiari difetti strutturali in entrambi gli strati della tunica delle spore mature che risultano parzialmente difettive nella capacità di germinare (Naclerio *et al.*, 1996; Zilhao *et al.*, 1999).

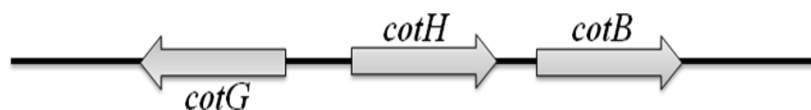
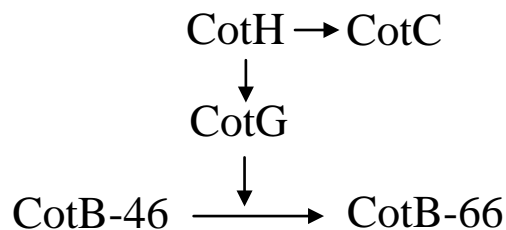


Figura 8: rappresentazione schematica del locus genico *cotG/cotH/cotB*. Le frecce indicano la direzione della trascrizione dei geni strutturali.

L'effetto pleiotropico della mutazione è dovuto alla capacità della proteina di interagire con almeno altri 9 componenti strutturali controllandone stabilità ed assemblaggio (Isticato et al., Driks 2009). È interessante notare che un mutante che esprime una maggiore quantità di CotH la proteina CotC sia accumula sia sulla tunica sia nella cellula madre (Isticato *et al.*; 2008), confermando il ruolo protettivo di CotH su CotC. Anche l'assemblaggio di CotB dipende in qualche modo da CotH ma in maniera indiretta. E' stato dimostrato, infatti, che la proteina CotG è direttamente responsabile della maturazione di CotB dalla forma di 46 kDa alla forma matura di 66 kDa che si ritrova sulla spora matura. Pertanto nel mutante *cotH* è presente solo la forma CotB-46 come conseguenza della mancanza di CotG sulla spora. Il modello tuttora accettato che rappresenta le modalità di interazione tra le suddette proteine è quello riportato qui sotto:



Isticato *et al.*; 2004, Zilhao *et al.*; 2004

1.11 Scopo della tesi

La tunica sporale è una struttura proteica complessa ed eterogenea che riveste un ruolo importante sia per la resistenza delle spore ad agenti chimici tossici, sia per garantire un'efficiente germinazione.

L'analisi delle basi molecolari che controllano la formazione della tunica ha evidenziato l'esistenza di sofisticati meccanismi regolativi, che agiscono a livello sia trascrizionale sia post-traduzionale, rendendo tale sistema biologico un interessante modello per lo studio dell'espressione genica e del differenziamento cellulare.

In tale contesto si inserisce il mio lavoro di dottorato, rivolto a chiarire i meccanismi alla base del processo di formazione e di assemblaggio della tunica sporale di *B.subtilis*.

In particolare mi sono interessata allo studio dell'espressione del gene *cotH* principalmente attraverso la costruzione e l'analisi di fusioni trascrizionali e traduzionali con il gene *reporter lacZ*. I miei studi hanno evidenziato che la regolazione del gene è più complessa di quanto finora riportato e che i geni *cotG* e *cotH* sono in realtà sovrapposti sul cromosoma.

Questo risultato ha dato origine a due linee di ricerca che ho seguito parallelamente:

1) come prima cosa mi sono chiesta se questa peculiare organizzazione genica fosse conservata tra i Bacilli sporigeni. In un recente lavoro pubblicato da Henriques *and* Moran (2007) rivolto allo studio dell'evoluzione dei geni *cot* di *B. subtilis*, è stato evidenziato che in linea generale, le proteine regolative sono molto conservate nelle varie specie di *Bacillus* e *Clostridium* analizzate, mentre, una serie di componenti strutturali sono estremamente specifici e risultano presenti solo in *B. subtilis*. Nell'analisi sono presenti anche le proteine CotH e CotG e, mentre la prima risulta conservata nella maggior parte delle specie analizzate, la seconda risulta presente solo in *B. subtilis* (tabella 1). Quest'osservazione mi ha fatto di conseguenza pensare che l'organizzazione del locus *cotG/cotH* non è comune tra i Bacilli sporigeni e mi ha spinto ad indagare maggiormente sulla origine evolutiva del locus genico.

Tabella 1: proteine della tunica sporale di *B. subtilis*. E' indicata la presenza (+) o l'assenza (-) della proteina ortologa nelle specie correlate: *B. cereus* (Bc),

		<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. clausii</i>	<i>B. halodurans</i>	<i>G. kaustophilus</i>	<i>O. iheyensis</i>	<i>C. perfirgens</i>	<i>C. acetobutylicum</i>	<i>C. tetani</i>	<i>C. thermocellum</i>	<i>C. novyi</i>	<i>C. cellulolyticum</i>	<i>C. difficile</i>
ColI (YiaA)	BG 13821
ColJC	BG 111801
ColS	BG 111380
ColSA	BG 111381
ColU	BG 111172
SodA	BG 111676
SpoVA	BG 10275
YaaH	BG 10080
YabG	BG 10106
YakK	BG 111340
YakK (LipC)	BG 111232
YhaK	BG 13000
YhrY	BG 13088
YbaQ	BG 10124
YhdD	BG 12181
YhaA	BG 12236
YusA	BG 14013
YuhH	BG 14044
YurE	BG 10347
ColF	BG 10012
YakY	BG 13104
ColM	BG 111822
YhuD	BG 13288
YhuP	BG 13318
Tgl	BG 10946
ColA	BG 10490
ColD	BG 10493
ColE	BG 10494
ColN (YqF)	BG 111696
ColO (YjX)	BG 13153
GarQ	BG 10608
SaA	BG 13781
SpoVM	BG 10776
SpoVID	BG 10346
TakA	BG 111697
YhoD	BG 13367
YppQ	BG 111448
YpeP	BG 111609
YpuA	BG 13764
YhuD	BG 13036
YhrR	BG 13084
ColV	BG 10496
ColW	BG 10497
ColX	BG 10500
ColY	BG 10498
ColZ	BG 10499
YodI	BG 13537
ColH	BG 111791
ColJA	BG 111790
ColJB	BG 111800
ColP	BG 12167
ColQ (YidP)	BG 12424
ColB	BG 10491
YaeE	BG 111881
ColC	BG 10492
ColD	BG 111017
ColR (YidO)	BG 12423
ColT	BG 10495
ColU	BG 13471
YidD	BG 13484
YaeK	BG 12825
YmeG	BG 13415
YphH	BG 13180
YieT (Cae15)	BG 12251
YopQ	BG 13650
YanD	BG 12335
YbaD	BG 111382
YurC	BG 14052
YwhH	BG 12512
YbiI	BG 10022

2) la seconda linea di ricerca è consistita nella costruzione per la prima volta, di un singolo mutante *cotG*⁻. Finora, infatti, i mutanti disponibili contenevano un'inserzione in *cotG* e pertanto, data la sovrapposizione con il gene *cotH*, causavano la contemporanea inattivazione del gene *cotH*. L'analisi del fenotipo strutturale e fisiologico delle spore mutanti mi ha permesso di chiarire alcuni aspetti finora non noti della funzione della proteina CotG.

2.Materiali e Metodi

2.1 Ceppi batterici

I ceppi di *B. subtilis* utilizzati in questo studio sono elencati nella Tabella 2. Per gli esperimenti di clonaggio e di sequenziamento è stato utilizzato il ceppo di *Escherichia coli* *DH5 α* (*supE44* Δ *lacU169* ϕ 80*lacZ* Δ *M15*) *hsdR17 recA1*) (Sambrook et al., 1989).

Tabella 2: ceppi *B. subtilis*

Ceppo	Genotipo	Provenienza
AZ54	Selvatico	Youngman et al 1984
AZ153	<i>gerE36</i>	Zheng & Losick 1990
GC237	<i>cotH::lacZ</i>	Baccigalupi et al 2004
GC240	<i>cotH::lacZ</i>	Baccigalupi et al 2004
ER203	<i>cotG::erm</i>	Naclerio et al., 1996
ER220	<i>CotH::cat</i>	Naclerio et al., 1996
RG4	<i>Del4::lacZ</i>	In questo lavoro
RG3	<i>Del3::lacZ</i>	In questo lavoro
RG5	<i>Del5::lacZ</i>	In questo lavoro
RG2	<i>Del2::lacZ</i>	In questo lavoro
RG1	<i>Del1::lacZ</i>	In questo lavoro
AZ528	<i>cotH::lacZ</i>	In questo lavoro
AZ529	<i>gerE36-cotH::lacZ</i>	In questo lavoro
AZ530	<i>cotH::lacZ</i>	In questo lavoro
AZ532	<i>gerE36-cotH::lacZ</i>	In questo lavoro
AZ535	<i>cotH</i> Δ _{5'UTR}	In questo lavoro
AZ603(Δ)	Δ <i>cotGcotH::Neo</i>	In questo lavoro
Δ /GH	Δ <i>cotGcotH::Neo</i>	In questo lavoro
Δ /GstopH	Δ <i>cotGcotH::Neo</i>	In questo lavoro
Δ /G	Δ <i>cotGcotH::Neo</i>	In questo lavoro

2.2 Terreni di coltura

Terreno TY: 0.5% di bacto-yeast extract, 1% di triptone, 0.5% di NaCl in H₂O distillata. Dove richiesto sono stati aggiunti i seguenti antibiotici: ampicillina (50 µg ml⁻¹), cloramfenicolo (5 µg ml⁻¹), neomicina (5 µg ml⁻¹) e spectinomycin (50 µg ml⁻¹), eritromicina (1 µg ml⁻¹).

Terreno per l'induzione della sporulazione DSM: Difco sporulation medium (DSM): 1 L di H₂O distillata; 8g di Bacto-nutrient broth (*Difco*); 10 ml di KCl 10% (w/v); 10 ml di MgSO₄·7H₂O 1.2% (w/v); 0.5 ml di NaOH 1 M; il terreno veniva autoclavato e raffreddato a 50°C prima di aggiungere le seguenti soluzioni sterili: 1 ml di Ca(NO₃)₂ 1 M; 1 ml di MnCl₂ 0.01 M; 1 ml di FeSO₄ 1 mM.

Terreno per l'induzione della sporulazione SM: *growth medium* 94ml CHI+CHII (940 ml H₂O distillata, 3.68g L-acido glutammico, 10g casiena, 1.25g L-alanina, 1.39g L-asparagina, 1.36g KH₂PO₄; 1.34g NH₄Cl, 0.11g Na₂SO₄, 0.10g NH₄NO₃, 1mg FeCl₃·6H₂O); 5ml CHIII (1L H₂O distillata, 1.98g MgSO₄·H₂O, 10% CaCl₂ w/v), 0.2ml CHIV (100 ml H₂O distillata, 1.1g MnSO₄·4H₂O), 1ml CHV (2mg/ml L-triptofano). *Resuspension medium* 88.9 ml H₂O distillata, 0.1ml soluzione A (100 ml H₂O

distillata, 0.089g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0.830g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 1.797g $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$); 1 ml soluzione B (5.35g NH_4Cl , 1.06g Na_2SO_4 , 0.68g KH_2PO_4 , 0.7g NH_4NO_3); 4 ml soluzione C (5% L-glutamato pH 7.0), 1 ml soluzione D (0.1M CaCl_2), 4 ml soluzione E (1m $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)

Terreni per la preparazione di cellule competenti di *B.subtilis*:

terreno SpC: 20 ml di T-base (0,4 g di $(\text{NH})_4\text{SO}_4$; 3,66 g di $\text{K}_2\text{HPO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$; 1,2 g di KH_2PO_4 ; 0,2 g di trisodio citrato $2\text{H}_2\text{O}$) autoclavato e raffreddato a 50°C prima di aggiungere le seguenti soluzioni sterili: 0,2 ml di glucosio 50%; 0,3 ml di $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2%; 0,4 ml di bacto-yeast extract 10%; 0,5 ml di casamminoacidi 1%;

terreno SpII: 20 ml di T-base (0,4 g di $(\text{NH})_4\text{SO}_4$; 3,66 g di $\text{K}_2\text{HPO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g di KH_2PO_4 ; 0,2 g di trisodio citrato $\times 2\text{H}_2\text{O}$) autoclavato e raffreddato a 50°C prima di aggiungere le seguenti soluzioni sterili: 0,2 ml di glucosio 50%; 1,4 ml di $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2%; 0,2 ml di bacto-yeast extract 10%; 0,2 ml di casamminoacidi 1%; 0,1 ml di CaCl_2 0,1M.

Piastre: ai terreni liquidi venivano aggiunti, prima della sterilizzazione, 20 g/L di Bacto-agar (*Oxoid*) quindi autoclavati, raffreddati a 50°C, venivano aggiunti gli opportuni antibiotici alle

concentrazioni desiderate, ove necessario venivano aggiunti IPTG (0,5 mM) e X-gal ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$ per *B. subtilis*, $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ per *E. coli*), e versati in capsule Petri sterili.

2.3 Preparazione di cellule competenti e trasformazione di *Escherichia coli*

Per rendere competenti all'ingresso di DNA cellule di *Escherichia coli*, una colonia batterica veniva inoculata in 5 ml di terreno TY e lasciata crescere a 37°C per 12 ore in agitazione. L'inoculo veniva diluito 1:100 in 30 ml di terreno TY e fatto crescere fino alla fase esponenziale (OD 590nm 0.4 - 0.6).

Le cellule venivano centrifugate a 4000rpm, per 5 min. a 4°C, risospese in 15 ml di una soluzione 50 mM CaCl_2 preraffreddata ed incubate in ghiaccio per 30 min. Dopo centrifugazione le cellule venivano risospese in 2 ml di una soluzione contenente glicerolo al 15% e 50 mM CaCl_2 , quindi aliquotate e conservate a -80°C.

La trasformazione veniva effettuata aggiungendo a 200 μl di cellule competenti, la miscela della reazione di ligasi; il tutto veniva incubato a 4°C per 30 min, poi a 42°C per 3 min, allo scopo di provocare uno shock termico necessario per il passaggio del DNA all'interno della cellula. Quindi venivano aggiunti 800

μl di TY ed i batteri venivano incubati a 37°C per 1 ora ed infine piastrati su piastre TY contenenti l'appropriato antibiotico.

2.4 Preparazione di cellule competenti e trasformazione in *B. subtilis*

Una colonia singola veniva strisciata su piastra TY ed incubata a 30°C per 12 ore. Tutte le colonie venivano recuperate, incubate in 20 ml di SpC e lasciate crescere a 37°C con agitazione. Dopo 4 ore, 2 ml di cellule venivano prelevati, inoculati in 20 ml di SpII e lasciati a 37°C con agitazione molto lenta per 1,5 ore. La coltura veniva quindi centrifugata a 7000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente ed il pellet veniva risospeso in 1,8 ml di sopranatante precedentemente recuperato e 0,2 ml di glicerolo al 100%.

Le cellule venivano quindi aliquotate e conservate a -80°C.

Per la trasformazione ad un'aliquota di cellule competenti, rapidamente scongelata a 37°C, veniva aggiunto un uguale volume di SpII contenente EGTA nel rapporto di 50 a 1. I batteri venivano quindi incubati a 37°C con agitazione per 40 minuti e piastrati su TY contenente l'opportuno antibiotico.

2.5 Purificazione del DNA plasmidico su larga scala

Una singola colonia batterica veniva inoculata in 50 ml di TY, contenente 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ di ampicillina e veniva fatta crescere una notte a 37°C.

Le cellule venivano raccolte mediante centrifugazione a 6000 rpm, per 5 min. a 4°C e risospese in 1 ml di un tampone contenente: 25 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA pH 8.0; 50 mM Glucosio. Dopo 5 min. di incubazione a temperatura ambiente, venivano aggiunti 2 ml di tampone di lisi (0,2 M NaOH; 1% SDS) e la miscela veniva incubata per 5 min. in ghiaccio. Venivano quindi aggiunti 1,5 ml di una soluzione di 3M acetato di sodio, pH 5.2 e ripetuta l'incubazione per 5 minuti in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 7000 rpm, per 10 minuti a 4°C il sopranatante veniva recuperato, estratto con fenolo saturato con 0,1 M Tris e precipitato per aggiunta di 2.5 volumi di etanolo. Il DNA plasmidico veniva raccolto mediante centrifugazione a 7000 rpm, per 10 minuti a 4°C, lavato con 5 ml di etanolo 70%, per rimuovere eventuali sali precipitati, e risospeso in 0,5 ml di TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0 ed EDTA 0.1 mM pH 8.0).

La purificazione di DNA plasmidico mediante cromatografia veniva effettuata con i kit DNA MINI-PREP e DNA MIDI-PREP (*QUIAGEN*), seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

2.6 Digestione enzimatica

Il DNA plasmidico, ottenuto col protocollo sopra citato, veniva digerito con enzimi di restrizione in un volume finale di 20 μ l, in presenza del tampone consigliato dalla casa fornitrice.

2.7 Elettroforesi su gel di agarosio

Gel di agarosio: 1 g agarosio (Molecular Biology Certified Agarose, *BIO-RAD*) in 100 ml TAE 1X (materiali e metodi 2.15) supplementato con 1 μ g/ml di bromuro di etidio.

Metodo: i campioni, a cui veniva aggiunto 1/10 del volume di una soluzione di caricamento (0.5% blu di bromofenolo; 30% glicerolo in acqua), venivano caricati su gel e fatti migrare a 100 Volts per 45 min. Accanto ai campioni veniva fatto migrare uno *standard* di peso molecolare costituito dal DNA del batteriofago λ preventivamente digerito con l'enzima *Bst*II.

2.8 Eluizione del DNA da gel di agarosio

I frammenti di DNA venivano eluiti da gel d'agarosio utilizzando il protocollo per eluizione QIAquick Gel Extraction Kit (*QIAGEN*). In corrispondenza delle bande di DNA d'interesse il gel veniva tagliato in pezzetti minuti e questi posti in tubi da 1.5 ml. L'agarosio veniva disciolto aggiungendo 3 volumi di tampone QG (*QIAGEN*) e incubando a 50°C per 10 min. La soluzione veniva poi caricata su una resina capace di legare il DNA, mentre la soluzione acquosa veniva eliminata dopo centrifugazione a 13000 rpm, per 1 min. Il DNA veniva, infine, eluito con 30 µl di TE.

2.9 Reazione di ligasi

Il frammento di DNA (inserto) veniva unito al DNA vettore in un rapporto molare di 5:1 ed incubato in presenza di 3 unità di enzima T4 DNA ligasi (*Gibco*) e del tampone di reazione 5X fornito dalla casa fornitrice (*Gibco*) in un volume finale di 10-15 µl per 12 ore a 16°C.

2.10 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Frammenti di DNA venivano amplificati per Polymerase Chain Reaction (PCR), utilizzando DNA cromosomale o plasmidico come stampo.

Tabella 3: oligonucleotidi utilizzati

Oligonucleotide	Sequenza 5'- 3' ^(a)	Sito di restrizione
Zsenso	ctaggcatgcCCGGGGATCCCGGTG	SpHI
Zanti	ctaggcatgcTTATTTTTGACACCAGACC	SpHI
Del3	gaattcccgggCAAATTCTCCGTCTCCACTGCG	EcoRI/SmaI
Del2	ggatccGTCTTTTGTAGTCGTCGAGTGG	BamHI
Del1	ggatccTGCGAGATTTCTTGTGAGAGC	BamHI
Del4	ggatccCGGTGCGACTTTTTATGACTG	BamHI
Del5	ggatccGCCTTTATCGTTAGGAT	BamHI
G	CGGTGCGACTTTTTATGAC	
G3	GTGAGTGCGGTGCGAC	
G22	TTCCGTACCTCCGCCGGCAGCC	
G24	AAACCAAATGATGCGGGTTGC	
G27	GGCTGCCGGCGGAGGTACGGAA	
G25	GTTTTCATTGTTTCAATAGGCTG	
H	cgcggatccgcgcgggaattcAGCGATATCAATATCCAG	BamHI/EcoRI
H12	TGTATAAGTGTTCCGCTGAGATCTTA	BamHI
H13	TCCTTGAATTCTTACATAATCG	EcoRI
H19	ggatccCCATAATCCTCCTTACAAATT	BamHI
H28	gcatgcAATTCAATAGCCTAATTGTC	SphI
H29	ctgcagGCCGGATGTGATCTGCGAG	PstI
H30	ggatccTGGAAAGCAGACAACTCTTCC	BamHI
H33s	caaatttaggctttattTGACATAACATATGCAACCC ^(b)	
H32s	AATAAAAGCCTAAAATTTGTAAGGAGGATTATGG	
Gstop	GCTTCTTCGATGTCAGAATGGGAATAG ^(c)	
Gstop anti	GGTGATAAGGGTAAGATCTGTAGCTTCTTC	
X2	ggatccGCCTTTATCGTTAGGAT	BamHI
B-anti	aagcttCGTCGGCATTATCTACAAGG	HindIII
Sp6	CATTTAGGTGACACTATAG	
T7	GGGATATCACTCAGCATAAT	

^(a)I nucleotidi in maiuscolo sono complementari alle sequenze presenti sul cromosoma di *B. subtilis*; quelli sottolineati sono i siti di riconoscimento per gli enzimi di restrizione indicati; ^(b)Le lettere minuscole indicano la sequenza complementare alla regione 5' dell'oligonucleotide H32s (sottolineata);

^(c)Le lettere in rosso indicano le basi inserite.

Gli oligonucleotidi mostrati in Tabella 2.2 (sintetizzati dalla *GIBCO BRL Custom Primers*), venivano utilizzati come innesco.

Nella miscela di reazione erano presenti: oligonucleotidi (5 μ M), dNTP (0,2mM), $MgCl_2$ (1,5 mM), PCR buffer 10X (*GIBCO*) e Taq DNA polimerasi (*GIBCO*, 5U), DNA stampo (20 ng).

Il programma di PCR eseguito prevedeva un primo ciclo di denaturazione (5 minuti a 95°C), 30 cicli di denaturazione (1 minuto a 95°C), annealing (1 minuto a 48-52°C, in base alla percentuale in C/G degli oligonucleotidi) e allungamento (1 minuto a 72°C) più 5 minuti a 72°C per la terminazione delle catene. I prodotti della reazione venivano poi visualizzati su gel di agarosio.

2.11 Preparazione di DNA cromosomale

Una colonia singola di *B. subtilis* veniva cresciuta in 25 ml di terreno TY a 37°C per 15-18 ore. La coltura batterica veniva centrifugata per 10 minuti a 5000 rpm a 4 °C e le cellule risospese in 4 ml di 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mg lisozima ed incubata 10 min. a 37°C. Dopo aggiunta di 0,3 ml di 20% sarkosyl l'incubazione a 37°C veniva continuata per altri 5 min. e la sospensione cellulare estratta due volte con fenolo saturato con cloroformio. Il DNA cromosomale veniva quindi precipitato con

due volumi di etanolo e raccolto per centrifugazione di 10 min. a 10000 rpm a 4 °C.

2.12 Primer extension

2.12.1 Estrazione degli mRNA

Le cellule erano prelevate 5 ore dopo l'inizio della sporulazione e la purificazione degli mRNA veniva effettuata con il kit RNeasy Mini (*QUIAGEN*), seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice. I batteri raccolti venivano centrifugati a 5000 xg per 5 min a 4°C. Successivamente il pellet veniva risospeso in 100 µl di tampone TE (supplementato con il lisozima) e lasciati per 5 min a temperatura ambiente. Poi venivano aggiunti 350 µl di RTL (supplementato con β-mercaptoetanolo) e 250 µl di etanolo 100%. La soluzione veniva poi caricata su una colonna contenente un filtro capace di legare l'RNA. Dopo lavaggi con i tamponi RW1 e RPE, l'RNA veniva, infine, eluito con 100µl di H₂O sterile, preventivamente trattata con il dietilpirocarbonato.

La concentrazione e la qualità dei campioni di RNA mediante letture allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda pari a 260 nm e per elettroforesi su gel di agarosio al 2%.

2.12.2 Trattamento con DNasi

Per purificare il campione di RNA, col protocollo sopra citato, il DNA cromosomale presente come contaminante veniva degradato mediante trattamento enzimatico con la DNasi (*Stratagene*) in un volume finale di 10 μ l. Veniva quindi allestita una reazione contenente: 1 μ g di RNA, 1 μ l del tampone di reazione 10X (200mM Tris-HCl pH8.4, 20mM MgCl₂) 1 μ l di DNasiI.

Il campione veniva incubato a 37°C per 30 minuti. Veniva poi aggiunto 1 μ l di tampone di inattivazione ed incubati a 65°C per 10 minuti.

2.12.3 Sintesi del cDNA

La sintesi del cDNA veniva effettuata utilizzando il protocollo consigliato dalla casa produttrice della retrotrascrittasi (*Stratagene*). Per allestire la reazione venivano usati 3 μ g di RNA, 1 μ l dell'oligonucleotide H 2.5 μ M e portati con H₂O ad un volume pari a 18 μ l. Dopo un'incubazione di 10min a 65°C, che consentiva la denaturazione di eventuali strutture secondarie presenti sull'RNA, venivano aggiunti 2.5 μ l di tampone 10X (500mM Tris-HCl pH 8.3, 750 mM KCl, 30 mM MgCl₂), 1 μ l di dNTP 5 mM, 2.5 μ l di DTT 100mM 1 μ l di enzima trascrittasi inversa. La reazione veniva incubata a 42°C per 1h, dopodiché

l'enzima veniva inattivato con trattamento termico a 72°C per 15min.

2.12.4 Primer extension

Questa tecnica è stata utilizzata per localizzare l'estremità 5' di un particolare trascritto in una miscela di molecole di RNA, utilizzando oligonucleotidi marcati con $[(\gamma\text{-}^{32}\text{P})]\text{dATP}$ (GEHealthcare) all'estremità 5' e complementari alla sequenza dell'mRNA che si vuole identificare. Consentendo l'appaiamento dell'oligonucleotide con il trascritto, e utilizzando la trascrittasi inversa (una DNA polimerasi RNA-dipendente), si ottiene la sintesi di un filamento di DNA complementare al trascritto in questione e marcato radioattivamente. Questo tipo di analisi è stata fatta utilizzando G25 (tabella 2).

L'esperimento consisteva nel precipitare 10µg di RNA con 1 pmole di oligonucleotide marcato con l'isotopo radioattivo ^{32}P . Si risospendeva in 6,9µl di H₂O e dopo 10 min a 70°C i campioni venivano incubati 30 min a 37°C, per consentire l'appaiamento dell'oligonucleotide con il trascritto complementare. La reazione di polimerizzazione si effettuava in un volume finale di 10µl aggiungendo 1µl di tampone 10X della trascrittasi inversa (Tris-HCl 500mM pH 8.3, DTT 100mM, MgCl₂ 60 mM e NaCl 1M) 0,8µl di dNTP 25mM (concentrazione finale 2mM), 0,3µl di

RNasina (inibitore dell'RNasi) ed 1 μ l di trascrittasi inversa. Si incubava a 48°C per 1 ora e si arrestava la reazione aggiungendo 5 μ l di soluzione di stop (95% formammide, 0.005% blu di bromofenolo, 0.05% xilene cianolo, 10mM EDTA). Il punto di inizio della trascrizione veniva identificato confrontando su gel di acrilamide al 6% la sequenza nucleotidica ed il prodotto della reazione di *primer extension* ottenute usando lo stesso oligonucleotide come innesco.

2.12.5 Marcatura terminale dell'oligonucleotide

Utilizzando ATP marcato in posizione γ con l'isotopo radioattivo ^{32}P , è possibile, con l'enzima polinucleotide chinasi, trasferire il ^{32}P all'estremità 5' dell'oligonucleotide e renderlo così identificabile con un'autoradiografia.

La reazione consisteva nell'aggiungere a 2 μ l di oligonucleotide (20 ng μl^{-1}), 10 μ l di (γ - ^{32}P) GTP (10mCi ml^{-1}), 1 μ l di polinucleotide chinasi (10 u μl^{-1}) e 3 μ l di tampone 10X (Tris-HCl 0.5M pH 7.5, MgCl_2 0.1M, DTT 50 mM, BSA 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$), portando ad un volume finale di 30 μ l con H_2O bidistillata. Si incubava a 37°C per 30 min. per eliminare il radioattivo in eccesso usavo il kit Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare) seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

2.12.6 Preparazione del DNA e reazioni di sequenza

Ad un'aliquota di 50 μl di DNA, preparato come descritto al paragrafo 2.5, venivano aggiunti 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ di RNasi A e 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ di RNasi T1. Dopo incubazione di 30 minuti a 37°C, il DNA veniva precipitato con 30 μl di 20% PEG₆₀₀₀/2.5M NaCl, recuperato per centrifugazione, lavato con etanolo 70% e risospeso in 18 μl di H₂O. Il DNA veniva poi denaturato con 2 μl di NaOH 2 N per 5 minuti a temperatura ambiente e ri-precipitato con 2 μl di NH₄Ac 5 M e 50 μl di etanolo. Dopo centrifugazione, lavaggi in etanolo 70% e risospensione il DNA veniva risospeso in 6 μl di H₂O bidistillata cui venivano aggiunti 2 μl del primer (120 ng) e 2 μl di tampone 5X (Tris-HCl 200 mM pH 7.5, MgCl₂ 100 mM e NaCl 250 mM). La miscela veniva incubata per 30 minuti a 37°C e ad essa venivano aggiunti 2 μl di dGTP mix, 1 μl di DTT 0.1 M, 1 μl di ³⁵S-dATP e 2 μl di T7 DNA polimerasi (*sequenase version 2.0 USB*). Prima dell'uso il dGTP mix, composto da dGTP 7.5 mM, dCTP 7.5 mM e dTTP 7.5 mM, veniva diluito 5 volte in H₂O e l'enzima DNA polimerasi (13 U ml^{-1}) veniva diluito 8 volte nel tampone di diluizione (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, DTT 5 mM e BSA 0.5 mg ml^{-1}). Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la miscela di reazione veniva

divisa in 4 campioni di 3.5 l ciascuno, ed ognuno di essi era incubato a 37°C con 2.5 l di uno dei quattro ddNTP. La reazione veniva arrestata con 4 µl di una soluzione composta da formammide 95%, bromofenolo 0.05%, xilene cianolo 0.05% e EDTA 10 mM.

2.12.7 Elettroforesi di DNA su gel di acrilammide

Gel di poliacrilammide-urea al 6% (6M urea): 45 ml di poliacrilammide 40%, 30 ml di TBE 10X, 126 g di urea, H₂O fino a 300 ml.

Metodo: i campioni venivano riscaldati a 95°C per 3 minuti e caricati su gel. Dopo opportuna migrazione, il gel veniva seccato a 80°C sotto vuoto per 2 ore ed esposto con lastre autoradiografiche FUJI RX a temperatura ambiente per un tempo variabile, generalmente 12-18 ore.

2.13 Tamponi di corsa per elettroforesi

Tampone di corsa per elettroforesi di DNA su gel di poliacrilammide (TBE 10X): 0.89M di Tris-HCl (pH 8.0), 0.89M di acido borico e 0.02M di EDTA.

Tampone di corsa per elettroforesi su gel di agarosio (TAE 10X): 0.89 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.89 M di acido acetico e 0.02 M.

Tampone di corsa per elettroforesi di proteine SDS-PAGE (5X):

15.1 g di Tris base; 94 g di glicina, pH 8.3; 50 ml di 10% SDS; acqua bidistillata fino a 1L.

2.14 Misura dell'attività β -galattosidasica

Dopo induzione della sporulazione, come descritto nel paragrafo 2.12, campioni da 1ml sono stati prelevati ad ogni ora dal T₀ fino al T₈, centrifugati a 13.000rpm e i pellet conservati a -80°C. Per misurare l'attività β -galattosidasica è stato utilizzato il metodo Miller (Miller, 1972). Ai pellet scongelati è stato aggiunto 1ml di una soluzione di Z-Buffer (60mM Na₂HPO₄ x 7H₂O, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄ x 7H₂O, 50mM β -mercaptoetanol) e 10 μ l di toluene per permeabilizzare le cellule. Dopo pre-incubazione a 30°C per 15min., ai campioni sono stati aggiunti 0.2ml di una soluzione (0.4% in Z-Buffer) di substrato ONPG (o-nitrofenol- β -D-galattopiranoside) ed è stata seguita la comparsa del colore giallo per un massimo di 60 minuti. La reazione è stata arrestata aggiungendo 500 μ l di una soluzione 1M di Na₂CO₃, registrando i minuti trascorsi dall'aggiunta del substrato.

I campioni sono stati centrifugati e sono state effettuate letture di assorbanza a 420 nm dei sopranatanti recuperati. L'attività

specifica β -galattosidasica è stata espressa in unità Miller, calcolate secondo la formula:

$$\frac{A_{420}}{\text{tempo} - \text{di} - \text{reazione} \times OD_{590}} \times 1000$$

2.15 Induzione della sporulazione in *B. subtilis*

La sporulazione veniva indotta per esaurimento dei substrati di crescita (Harwood and Cutting, 1990). Una colonia singola di *Bacillus subtilis* veniva inoculata in 2.5 ml di TY e incubata per 5-6 ore in condizione di forte agitazione; 0.5 ml di tale inoculo veniva trasferito in 200 ml di DSM ed incubato a 37°C con forte agitazione. L'aumento della densità cellulare veniva seguito mediante letture spettrofotometriche effettuate a 590 nm e la crescita cellulare registrata, tracciando una curva di crescita su carta semilogaritmica. La fine della fase esponenziale viene considerata per convenzione come l'inizio del processo di sporulazione e viene indicata come T_0 . Negli esperimenti di *time course* venivano prelevate aliquote a distanza di 1 ora.

2.15.1 Purificazione delle spore mature

Per ottenere le spore mature, dopo 36 ore di crescita la coltura veniva centrifugata a 10.000 rpm (Bekman J2-HS) a 4°C per 10

min, risospesa in H₂O e lasciata a 4°C per due giorni. Poi veniva sottoposta a due cicli di lavaggio con: i) 50 ml di una soluzione contenente 1 M KCl-0.5 M NaCl; ii) 50 ml di 50 mM Tris-HCl pH 7.2. Dopo incubazione di 30 min. a 37°C con lisozima (50 µg/ml) per eliminare le cellule vegetative eventualmente rimaste, le spore venivano raccolte e sottoposte ad una serie di lavaggi con: i) 1M NaCl; ii) H₂O deionizzata; iii) 0.05% SDS; iv) TEP (50 mM Tris-HCl pH 7.2; 10 mM EDTA; 2 mM fenilmetilsulfonilfluorato); v) H₂O deionizzata. Le spore venivano aliquotate e risospese in 0,5 ml di H₂O deionizzata e conservate a -20°C o 4°C a seconda dell'utilizzo.

2.15.2 Lisi delle cellule in sporulazione mediante sonicazione

Le cellule batteriche raccolte a T6 sono state lavate 2 volte in 5mL di tampone contenente 50mM Tris-HCl pH 7.6; 1mM DTT; 0.1mM PMSF; 10% Glicerolo, risospese in 500µl di tale tampone e sottoposte a lisi mediante un trattamento con ultrasuoni a 14000Htz di frequenza; è stata fatta una sonicazione di 10 minuti, ogni ciclo comprende 30 secondi di sonicazione e 30 secondi di pausa (Sonicator XL2020 Misonix Incorporated). La procedura è stata eseguita mantenendo la sospensione batterica sempre in ghiaccio, per ridurre l'innalzamento della temperatura che si verifica durante la sonicazione. Il lisato cellulare così ottenuto è

stato centrifugato a 13000rpm per 20 min a 4°C. Il sopranatante contenente le proteine della cellula madre, è stato recuperato e conservato a -20°C. Il pellet è stato utilizzato per estrarre le proteine della prespora.

2.16 Estrazione delle proteine del rivestimento sporale

Il numero delle spore purificate ottenuto veniva determinato per conta di diluizioni seriali con la camera di Burker al microscopio ottico (Olympus BH-2 con lenti 40x).

2.16.1 Estrazione con SDS

Un'aliquota di spore è stata centrifugata a 7000rpm per 5 minuti, risospesa in 33µl di una soluzione di estrazione contenente 50mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 50mM DTT e incubata per 60 minuti a 65°C con agitazione, per solubilizzare le proteine della tunica sporale. La miscela è stata centrifugata a 13.000rpm per 10 minuti e il sopranatante, contenente le proteine, è stato raccolto e conservato a -20°C.

2.16.2 Estrazione alcalina

Un'aliquota ($>1 \times 10^{10}$ spore/ml) di spore veniva centrifugata a 12.000g per 10 min. a 4°C, risospesa in 100 µl di una soluzione di NaOH 0.1 M e incubata per 30 min. a 4°C per solubilizzare le proteine della tunica sporale. La miscela veniva centrifugata a

12.000g per 10 min. in ghiaccio e il sopranatante, contenente le proteine, veniva raccolto e conservato a -20°C.

Indipendentemente dal tipo di estrazione, per l'analisi SDS-PAGE è stata determinata la concentrazione proteica del sopranatante ed è stato aggiunto il Sample Buffer (1X: SDS 2%, glicerolo 10%, β -mercaptoetanolo 5%, Tris-HCl 440mM pH 6.8, Blu-dibromofenolo 0.1%), i campioni sono stati denaturati mediante bollitura a 100°C per 3min.

2.17 Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione delle proteine estratte veniva determinata mediante saggio colorimetrico (saggio *Bradford*). All'estratto proteico, portato ad un volume di 800 μ l con H₂O deionizzata, venivano aggiunti 200 μ l di BIO-RAD *protein assay* (BIO-RAD) ed il colore sviluppato misurato spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 595nm. La concentrazione della proteina veniva ricavata riportando i valori ottenuti su una retta di taratura, costruita utilizzando una soluzione di BSA (sieroalbumina bovina) di concentrazione nota. La concentrazione proteica di ogni singolo campione era data dalla media delle misurazioni di tre diversi volumi di estratto proteico.

2.18 Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)

Gel al 5% di poliacrilammide (upper gel): 0.67 ml di 30% acrilammide-bisacrilammide (37.5:1); 0.5 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8; 0.04 ml di 10% sodio dodecilsolfato (SDS); 0.04 ml di 10% persolfato di ammonio (APS); 0.004 ml di TEMED; acqua fino a 4 ml.

Gel al 12% di poliacrilammide (lower gel): 4 ml di 30% acrilammide-bisacrilammide (37.5:1); 2.5 ml di 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8; 0.1 ml di 10% SDS; 0.1 ml di 10% APS; 0.004 ml di TEMED; acqua fino a 10 ml.

Gel al 15% di poliacrilammide (lower gel): 5 ml di 30% acrilammide-bisacrilammide (29:1); 2.5 ml di 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8; 0.1 ml di 10% SDS; 0.1 ml di 10% APS; 0.004 ml di TEMED; acqua fino a 10 ml.

Metodo: gli esperimenti per SDS-PAGE sono stati effettuati utilizzando l'apparecchio Protean II (*BIO-RAD*). Alle proteine estratte con NaOH è stato aggiunto sample buffer 5X (0.4 M Tris-HCl pH 6.8; 26% glicerolo; 10% mercaptanolo; 1% SDS; 0.005% blu di bromofenolo). I campioni sono stati denaturati a 100°C per 3 minuti, raffreddati in ghiaccio. Le proteine estratte con SDS o con NaOH 0.1M , sono state caricate sul gel. È stato usato un

marcatore di peso molecolare noto (LMW electrophoresis calibration, Pharmacia-Biotech), fatto migrare in uno dei pozzetti.

2.19 Elettrotrasferimento di proteine e western blot

Le proteine migrate sul gel al 12% o 15% di poliacrilammide sono state sottoposte ad elettrotrasferimento su una membrana di nitrocellulosa utilizzando l'apparecchio semidry transfer cell (*BIO-RAD*). Il trasferimento è stato eseguito a 12-15 Volts per 15-30 minuti utilizzando come tampone per elettrotrasferimento: TG (Tris-Glicina) con 20% di Metanolo. Per verificare l'esito dell'elettrotrasferimento, la membrana è stata colorata con una soluzione di Ponceau S (*Sigma*), poi decolorata completamente con acqua bidistillata. La membrana è stata poi incubata in 50 ml di soluzione di saturazione (1X PBS; 5 gr di bovalbumina) per un'ora a RT con agitazione lenta o over-night a 4°C. Successivamente il filtro è stato incubato con l'anticorpo primario specifico diluito 1:500 o 1:5000, dipende dall'anticorpo primario utilizzato, in *Block Solution* (1X PBS; 1% Tween 20; 5 gr di ovalbumina) a temperatura ambiente per 3-4 ore, nuovamente lavata con la soluzione *Block Solution* (10% di latte in polvere in tampone PBS 1X) ed incubata con l'anticorpo secondario (anti-rabbit o anti mouse coniugato con perossidasi, *Sigma*) per 1 h a

temperatura ambiente. Dopo ulteriori lavaggi con la *Block Solution*, le proteine, eventualmente riconosciute dall'anticorpo primario, sono state visualizzate sviluppando il filtro con il metodo ECL (*Amersham*), seguendo le istruzioni della ditta fornitrice.

2.20 Colorazione di gel di poliacrilammide per Coomassie

Il gel veniva fissato e colorato mediante immersione nella soluzione colorante (625 mM coomassie brilliant-blue; 50% metanolo; 10% acido acetico) per 30 min., quindi decolorato con la soluzione (50% metanolo-10% acido acetico). Il gel veniva poi lasciato 1 ora nella soluzione decolorante a cui veniva aggiunto glicerolo al 10% ed infine seccato a 80°C sotto vuoto per 2 ore.

2.21 Misura della resistenza al lisozima

Per valutare la capacità di resistenza al lisozima, una aliquota di spore corrispondente a circa 0,4 OD₅₈₀, è stata incubata con 15 ml di Tris-HCl 10mM (pH 7) in presenza di 250µg/ml di lisozima, per 10 minuti a 37°C. La diminuzione della densità ottica è stata monitorata a 580nm, attraverso delle letture spettrofotometriche eseguite ogni minuto per un tempo totale di 10 minuti.

2.22 Misura dell'efficienza di germinazione

Le spore purificate come descritto nel paragrafo 2.15 sono state incubate per 30 minuti a 70°C per facilitare l'induzione della germinazione. Una volta attivate, le spore sono state diluite in 15mL di Tris HCl 10mM (pH 8) contenente 1mM fruttosio, 1mM glucosio e 10mM KCl (sol. FGK). La germinazione è stata indotta dall'aggiunta di 100 µl di 10mM L-asparagina e le variazioni di assorbanza a 580nm sono state seguite ad intervalli di 5 minuti fino al raggiungimento di valori costanti.

L'efficienza di germinazione è stata riportata come valore percentuale della diminuzione di assorbanza secondo la seguente formula (Harwood and Cutting, 1990):

$$\% \text{ diminuzione di OD a } T_1 = \frac{\text{OD a } T_1}{\text{OD a } T_0} \times 100$$

3. Risultati

3.1 Analisi dell'espressione del gene *cotH*

I geni *cotH* e *cotG* sono adiacenti sul cromosoma di *B. subtilis* e trascritti in direzione opposta sui due filamenti di DNA (Naclerio *et al.*, 1996). I due geni sono espressi in maniera differenziata, con *cotH* espresso tra 4 e 6 ore dopo l'inizio della sporulazione (Baccigalupi *et al.*, 2004) e *cotG* espresso dopo 6 ore dall'inizio della sporulazione (Sacco *et al.*, 1995). Entrambi i geni sono trascritti grazie al fattore σ^K dell'RNA polimerasi ed il diverso tempo di espressione è dovuto all'intervento del regolatore trascrizionale GerE che agisce da repressore di *cotH* e da attivatore di *cotG* (Sacco *et al.*, 1995; Baccigalupi *et al.*, 2004).

La diminuzione dell'espressione del gene *cotH* potrebbe essere dovuta sia al legame del repressore al DNA, sia all'ingombro sterico dovuto alla collisione delle RNA polimerasi quando viene attivata la trascrizione del gene *cotG* in direzione opposta. Per chiarire questo punto ho trasferito la fusione traduzionale tra il gene *cotH* ed il gene reporter *lacZ* al locus *amyE* di *Bacillus subtilis*.

A tale scopo veniva utilizzato il vettore di integrazione pDG364 (Cutting and Vander Horn, 1990) che presenta, come marcatore selezionabile in *B. subtilis* il gene per la resistenza all'antibiotico cloramfenicolo (*cat*) inserito, insieme ad un *polycloning site*, tra due regioni del gene non essenziale *amyE* di *B. subtilis*.

La fusione genica *cotH::lacZ* veniva amplificata per PCR utilizzando il DNA cromosomale del ceppo GC240 (Baccigalupi *et al.*, 2004) come stampo e gli oligonucleotidi Z-senso e Z-anti (tabella 2) complementari alle sequenze localizzate alle estremità 5' e 3' dell'intera fusione genica e contenenti alle estremità il sito di restrizione per l'enzima *SphI*, come innescio della reazione di polimerizzazione. Il prodotto di amplificazione, della grandezza attesa di 3.500 coppie di basi, veniva clonato nel vettore pGemT-easy (*Promega*), un vettore commerciale specificamente utilizzato per il clonaggio di prodotti di PCR. Uno dei cloni ricombinanti veniva sottoposto a reazione di sequenziamento (effettuata dalla BMR Genomics di Padova) in modo da

verificare l'assenza di eventuali mutazioni casualmente introdotte durante la reazione di PCR. La fusione genica veniva quindi subclonata nel vettore d'integrazione pDG364, e il plasmide ottenuto pDel4 era linearizzato per digestione con l'enzima di restrizione *PstI* ed utilizzato per trasformare cellule di un ceppo selvatico di *B. subtilis* (AZ54) rese competenti come descritto in Materiali e Metodi. I cloni resistenti al cloramfenicolo ottenuti erano il risultato di un evento di doppio *crossing-over* tra le regioni del gene *amyE* presenti sul plasmide ricombinante e sul cromosoma (figura 9).

Il ceppo risultante veniva chiamato RG4.

Inaspettatamente nessuno dei trasformanti presentava l'attività enzimatica attesa in base a quanto osservato con la stessa fusione traduzionale integrata al locus *cotH* (ceppo GC240; Baccigalupi *et al.*, 2004). Tale risultato indicava che la regolazione del gene *cotH* era più complessa di quanto finora immaginato e che per l'espressione del gene era necessaria una regione di DNA che si estendeva più di 400 basi a monte della sequenza

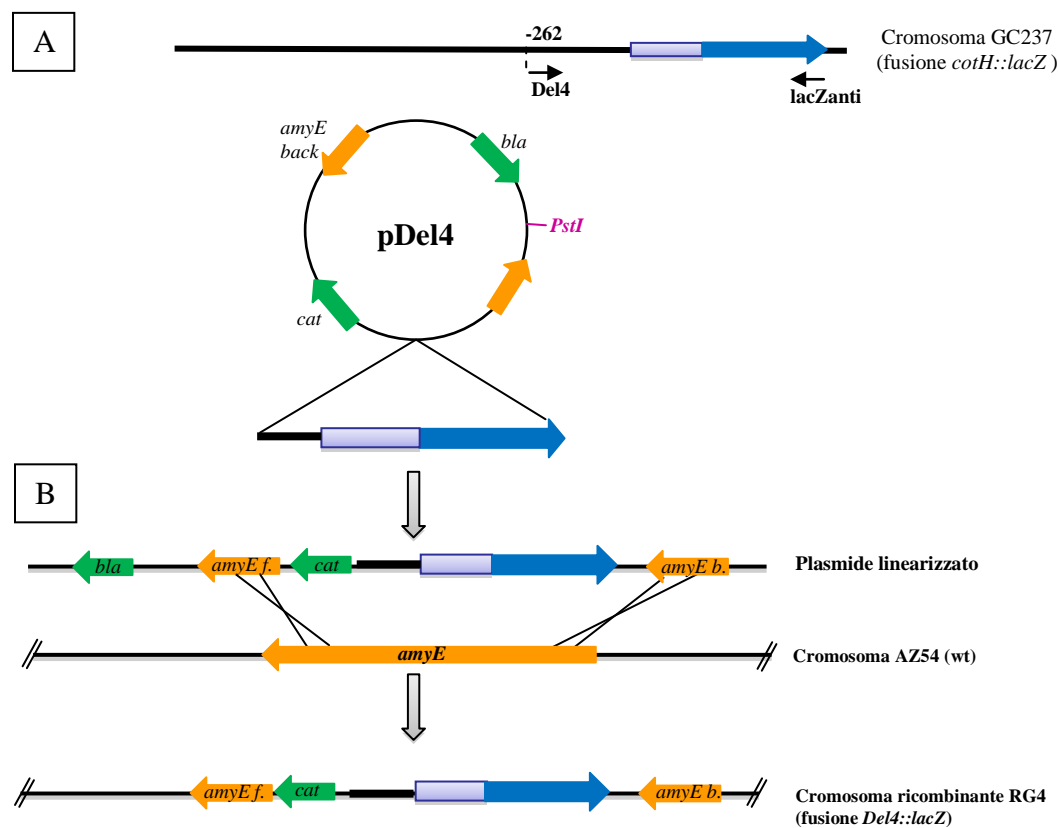


Figura 9: **A)** schema riassuntivo della costruzione del plasmide pDel4; **B)** schema d'integrazione del fusione *Del4::lacZ* al locus *amyE* del cromosoma di *B.subtilis* mediante un doppio evento di *crossing-over*. In viola è riportato il sito di restrizione dell'enzima utilizzato per linearizzare il plasmide.

codificante. Decidevo quindi di effettuare un'analisi per delezione della regione promotrice per individuare la minima regione sufficiente a garantire la normale espressione del gene.

3.1.1 Analisi per delezione

Per ottenere la fusione di regioni di grandezza crescente a monte di *cotH* con il gene reporter *lacZ*, utilizzavo come stampo il DNA cromosomale del ceppo GC237 (contenente la fusione traduzionale *cotH::lacZ* al locus *cotH*) e l'oligonucleotide Z-anti in coppia con gli oligonucleotidi Del3, Del5, Del2 e Del1, per allestire 4 reazioni di PCR indipendenti in modo da amplificare sequenze che distano rispettivamente 1145, 891, 654 e 399 basi dall'ATG del gene *cotH* (figura 10). I prodotti di amplificazione, della grandezza attesa venivano clonati nel vettore pGemT-easy (*Promega*), un vettore commerciale specificamente utilizzato per il clonaggio di prodotti di PCR. I cloni ricombinanti venivano sottoposti a reazione di sequenziamento (effettuata dalla BMR Genomics di Padova) in modo da verificare l'assenza di

eventuali mutazioni casualmente introdotte durante la reazione di PCR. Le fusioni geniche venivano quindi subclonate nel vettore d'integrazione pDG364, e i plasmidi ottenuti, rispettivamente chiamati pDel3, pDel5, pDel2 e pDel1, venivano linearizzati per digestione con l'enzima di restrizione *PstI* ed utilizzati per trasformare cellule di un ceppo selvatico di *B. subtilis*, AZ54, rese competenti come descritto in Materiali e Metodi. I cloni resistenti al cloramfenicolo ottenuti erano il risultato di un evento di doppio *crossing-over* tra le regioni del gene *amyE* presenti sul plasmide e sul cromosoma. I ceppi ricombinanti venivano rispettivamente chiamati RG3, RG5, RG2 e RG1. Come indicato in figura 10, i ceppi ricombinanti contenenti le fusioni a partire dagli oligonucleotidi Del4, Del1 e Del2, contenenti sequenze via via crescenti a monte della regione codificante del gene *cotH*, non presentavano alcuna attività enzimatica, mentre quelli con le fusioni *Del5::LacZ* e *Del3::LacZ* presentavano l'attività β -galattosidasica attesa.

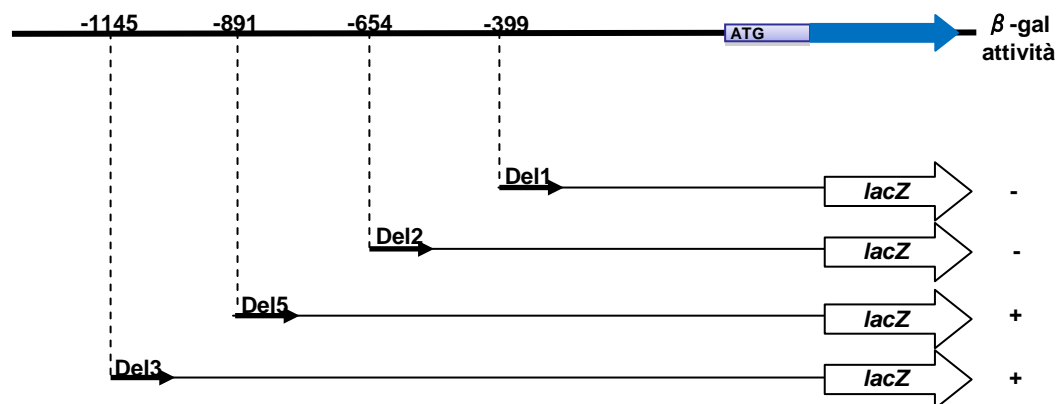


Figura 10: Mappa delle fusioni *cotH::lacZ* trasferite al locus *amyE* di *B. subtilis*. Le frecce nere rappresentano gli oligonucleotidi utilizzati in coppia con *lacZ*-anti per la costruzione delle diverse fusioni traduzionali. Sono indicate: i) le distanze dei vari oligonucleotidi rispetto all'ATG del gene *cotH*; ii) la presenza (+) o assenza (-) di l'attività β-galattosidasi attesa

Per verificare che la regione che si estendeva fino a Del5 contenesse tutte le sequenze regolative necessarie per l'espressione di *cotH*, la stessa fusione genica è stata trasferita anche in un mutante *gerE* ed il profilo dell'attività enzimatica durante la sporulazione è stato confrontato con quello ottenuto con i ceppi wt e *gerE* recanti la fusione al locus *cotH*. Come si osserva in figura 11, i profili d'attività enzimatica ottenuti sono sovrapponibili e pertanto la regione che si estende fino a 891 basi dall'ATG contiene tutti i segnali necessari per l'espressione del gene a valle.

Nella maggioranza dei casi noti nei procarioti, le sequenze regolative sono localizzate entro 300-400 coppie di basi a monte della sequenza codificante. Le maggiori dimensioni del tratto di DNA richiesto nel caso *cotH*, mi facevano ipotizzare che tale regione potesse essere coinvolta in un peculiare processo regolativo dovuto o al legame di regolatori trascrizionali o alla formazione di strutture secondarie sull'mRNA.

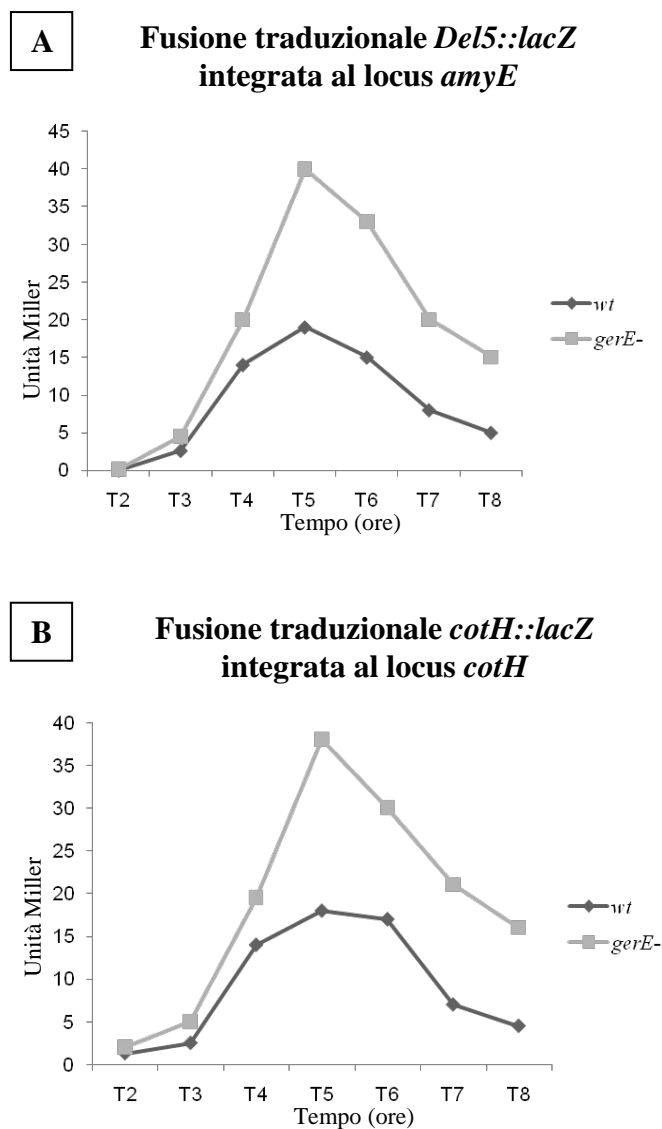


Figura 11: A) analisi dell'attività β -galattosidasica durante la sporulazione nei ceppi wt (■) e *gerE*⁻ (■) contenenti la fusione traduzionale *Del5::lacZ* integrata al locus *amyE*. B) analisi dell'attività β -galattosidasica durante la sporulazione nei ceppi wt (■) e *gerE*⁻ (■) contenenti la fusione traduzionale *cotH::lacZ* integrata al locus *cotH*.

Per chiarire questo punto ho cercato innanzitutto di capire se tale regione fosse trascritta e se fosse parte di un'unica unità trascrizionale comprendente anche la regione codificante per CotH.

3.1.2 Analisi della regione regolativa del gene *cotH*

La regione di circa 900 basi necessaria per l'espressione del gene *cotH* potrebbe essere il sito di legame di eventuali regolatori trascrizionali oppure essere parte della sequenza trascritta. Per discriminare tra queste due ipotesi, decidevo di effettuare un esperimento di retro-trascrizione su RNA estratti da cellule in sporulazione nella fase in cui il gene *cotH* viene massimamente espresso (T5). A tale scopo il ceppo selvatico AZ54 veniva cresciuto in terreno DSM, che induce la sporulazione, ed un'aliquota delle cellule batteriche veniva prelevata dopo 5 ore a partire dall'inizio della sporulazione e quindi processata per l'estrazione dell'RNA totale utilizzando un kit commerciale (*Qiagen*).

La qualità del campione veniva controllata dopo migrazione su gel di agarosio al 2% per verificare che non si fosse degradato durante la procedura di estrazione e quindi trattato con l'enzima DNasi, come descritto in Materiali e Metodi, allo scopo di eliminare tutto il DNA cromosomale, eventualmente presente come contaminante. Infine, l'RNA purificato veniva quantificato mediante letture allo spettrofotometro.

Un'aliquota di circa 2 µg di RNA veniva sottoposta a retro-trascrizione utilizzando l'oligonucleotide H, localizzato nella sequenza codificante del gene *cotH* e diretto verso l'estremità 5' del gene. Successivamente, il cDNA ottenuto veniva amplificato per PCR utilizzando l'oligonucleotide H in coppia con una serie di oligonucleotidi localizzati rispettivamente in sequenze via via più a monte rispetto all'ATG. Il risultato della PCR veniva visualizzato dopo migrazione dei campioni su gel di agarosio al 1% e l'eventuale presenza di un prodotto di amplificazione era dovuta all'amplificazione del cDNA prodotto durante la reazione di retrotrascrizione.

Per controllo, la stessa reazione di PCR veniva effettuata anche sui campioni di RNA trattati con DNasi ma non sottoposti a retro-trascrizione (C-) e che, in assenza di contaminazione di DNA cromosomale, non danno alcun prodotto di amplificazione. Parallele reazioni di PCR venivano effettuate come controllo positivo dell'esperimento usando come stampo il DNA cromosomale (C+).

Come mostrato in figura 12 un prodotto di amplificazione della grandezza attesa veniva osservato solo con l'oligonucleotide G22 e quelli a valle di esso (Del2 e Del4), mentre nessun prodotto di amplificazione veniva osservato con l'oligonucleotide G24 e quelli a monte di esso (Del5, dato non mostrato). Tale risultato mi permetteva di concludere che la regione di DNA, a monte di quella codificante per il gene *cotH*, è trascritta e che il sito di inizio della trascrizione è compreso tra gli oligonucleotidi G22 (-773 bp) e G24 (-845bp).

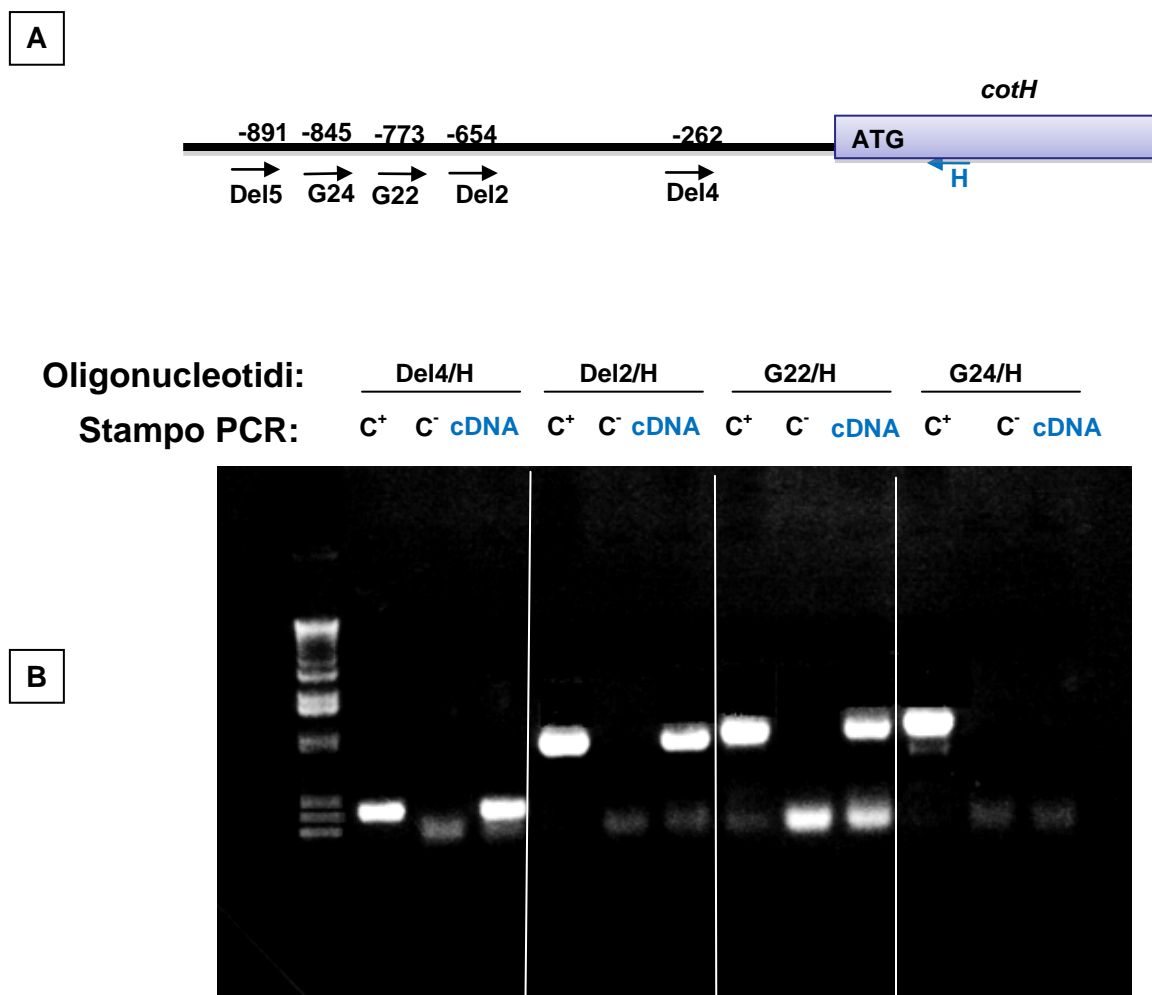


Figura 12: **A)** mappa schematica del cromosoma del ceppo selvatico di *B. subtilis*. È riportata la posizione degli oligonucleotidi utilizzati nella PCR (rispetto all'ATG del gene *cotH*) ed in blu è indicato il primer utilizzato per la sintesi del cDNA. **B)** fotografia del gel di agarosio in cui sono visualizzati i prodotti di PCR ottenuti con le coppie di oligonucleotidi indicate in figura e nello schema. Come stampo sono stati utilizzati: DNA cromosomale (C⁺); RNA non retrotrascritto (C⁻); cDNA ottenuto con l'oligonucleotide H (cDNA).

3.1.3 Analisi della sequenza a monte del gene *cotH*

I dati finora ottenuti mostrano che il sito d'inizio della trascrizione del gene *cotH* è localizzato almeno 773 basi a monte dell'ATG. L'ipotesi che tale regione trascritta sia anche tradotta appare improbabile in quanto, l'analisi della sequenza di tale regione indica la presenza di alcuni codici di lettura aperti (ORFs), di cui la più estesa potenzialmente codificante per una proteina di 370 aminoacidi. Tuttavia non si osservano segnali canonici di traduzione quali la sequenza di Shine-Dalgarno e una probabile tripletta d'inizio (ATG, TTG). È quindi improbabile che la sequenza in questione codifichi per un prodotto proteico, giacché è noto che in *Bacillus subtilis*, più che in altre specie, la presenza di una sequenza di Shine-Dalgarno canonica è un requisito indispensabile per l'inizio della traduzione (Rocha EP *et al.*, 1999). Ho comunque deciso di costruire una fusione traduzionale utilizzando la ORF più estesa e il gene *repoter lacZ*, per verificare se la sequenza era in grado di determinare l'espressione della β -galattosidasi, ma non è stata rilevata

alcuna attività enzimatica, né in terreni ricchi né in quelli per indurre la sporulazione. Tale risultato mi permetteva di concludere che la lunga regione di DNA a monte dell'ATG del gene *cotH* è trascritta ma non tradotta e veniva pertanto chiamata 5'UTR.

Mi proponevo a questo punto di individuare il sito d'inizio della trascrizione del gene *cotH* mediante un esperimento di *primer extension* e di caratterizzarne l'attività mediante la costruzione di fusioni trascrizionali tra il promotore ed il gene *reporter lacZ*.

3.1.4 Identificazione del sito d'inizio della trascrizione

Per localizzare il sito d'inizio della trascrizione veniva effettuato un esperimento di *primer extension* su RNA estratti a T5 dal ceppo selvatico, AZ54, e dai ceppi isogenici mutanti nei geni *spoIVB* (*spoIVB::erm*) e *gerE* (*gerE36*) che non esprimono, rispettivamente, il fattore σ^K dell'RNA polimerasi ed il regolatore trascrizionale GerE. I campioni di RNA sono stati preparati come descritto in Materiali e Metodi ed un'aliquota

corrispondente a 10 μg è stata precipitata con l'oligonucleotide G25 preventivamente marcato terminalmente (Materiali e Metodi 2.12.5). I campioni sono stati quindi sottoposti a retrotrascrizione con l'enzima *reverse transcriptase* (Stratagene) ed i prodotti della reazione sono stati separati su gel di acrilammide accanto alle 4 reazioni di sequenziamento ottenute utilizzando lo stesso oligonucleotide per l'innescio della reazione di polimerizzazione. La figura 13 mostra il risultato ottenuto dopo 15 ore di esposizione del gel ad una lastra per autoradiografia: un prodotto di estensione unico è presente nel ceppo selvatico ed in misura maggiore nel ceppo *gerE*⁻, mentre non si osserva alcun prodotto nel mutante che non esprime il fattore σ^{K} . Questi dati sono in linea con quanto osservato precedentemente (Naclerio *et al.*, 1996; Baccigalupi *et al.*, 2004) mediante l'analisi delle fusioni traduzionali *cotH::lacZ* e indica che il promotore da me individuato è responsabile dell'espressione del gene *cotH*.

L'analisi dei prodotti ottenuti dalle reazioni di sequenziamento fatti migrare parallelamente accanto alla *primer extension*, indica che il sito d'inizio della trascrizione (+1) è localizzato ad una distanza di 812 bp dall'ATG di *cotH*. A monte di esso è possibile individuare le sequenze consenso canoniche -10 e -35 riconosciute dal fattore σ^K dell'RNA polimerasi, e 4 possibili siti di legame per GerE (GerE-box) di cui tre orientati nella stessa direzione del gene *cotH* e uno (GerE-box 4) diretto divergentemente (figura 13).

Per confermare che il promotore da me individuato conserva tutti i segnali necessari per l'espressione ottimale del gene *cotH*, e per capire se la regione 5'UTR influenzasse l'espressione del gene a valle, decidevo di costruire due fusioni trascrizionali con il gene *lacZ*: la prima contenente solo la regione promotrice e la seconda contenente l'intera 5'UTR.

3.1.5 Costruzione delle fusioni trascrizionali *cotH::lacZ* ed integrazione in *B.subtilis*

Le fusioni trascrizionali tra la regione promotrice ed il gene *reporter lacZ* sono state costruite utilizzando il pSN32, un vettore di integrazione di *B. subtilis* che contiene la sequenza di legame per i ribosomi e quella codificante per il gene *reporter lacZ* a valle di un *polylinker* che viene utilizzato per il clonaggio. Tra il *polylinker* e il sito di legame per il ribosoma, sono inoltre presenti due codoni non-senso posizionati su due diversi quadri di lettura, allo scopo di bloccare eventuali traduzioni aspecifiche guidate dal frammento clonato a monte. Il vettore contiene inoltre a monte ed a valle del gene per la β -galattosidasi, le sequenze 5' e 3' del gene non essenziale *amyE* di *Bacillus subtilis*, che consentono l'integrazione del plasmide sul cromosoma al locus *amyE* (figura 14). L'utilizzo di tale vettore permette quindi di misurare l'attività trascrizionale di un promotore attraverso la misura dell'attività β -galattosidasica.

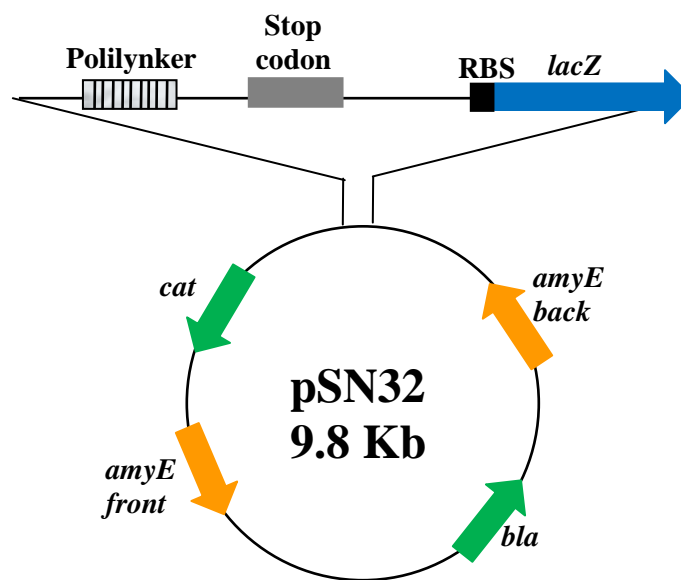


Figura 14: Vettore di integrazione pSN32 utilizzato per la costruzione di fusioni trascrizionali. A valle del sito di clonaggio (tratteggiato) sono presenti due codoni non-senso (grigio) e la sequenza del gene *lacZ* (blu), contenente la sequenza di Shine-Dalgarno (RBS, nero). Sono inoltre indicate le sequenze *amyE front* e *back* (arancione) per l'integrazione cromosomica e le cassette per la resistenza agli antibiotici (verde).

Mediante l'utilizzo della PCR, ho amplificato, dal DNA cromosomale di un ceppo selvatico di *B. subtilis*, dei frammenti di lunghezza diversa utilizzando le coppie di oligo X2/H19 (892 bp, contenente il promotore e la 5'UTR di *cotH*) e Del3/G27 (372 bp, contenente solo il promotore di *cotH*). I prodotti di PCR venivano purificati e clonati nel vettore pGemT-easy, escissi mediante digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione *BamHI/EcoRI* ed infine subclonati nel vettore pSN32 precedentemente digerito con gli stessi enzimi.

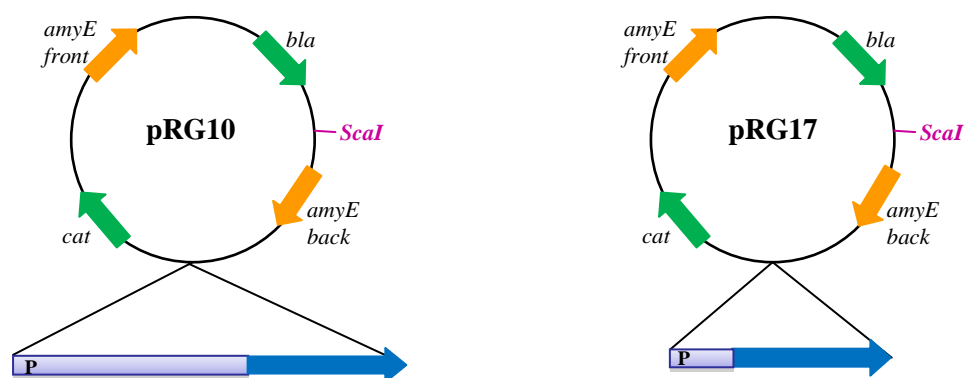
I plasmidi ricombinanti ottenuti venivano rispettivamente chiamati pRG10 e pRG17 (figura 15).

Tali plasmidi sono stati linearizzati con *ScaI* ed utilizzati per trasformare un ceppo selvatico di *B. subtilis*. I trasformanti ottenuti resistenti al cloramfenicolo, sono il risultato di un doppio evento di *crossing-over* tra le regioni *amyE* presenti sul plasmide e sul cromosoma. L'espressione del gene *reporter lacZ* nei ceppi ricombinanti veniva valutata piastrando i trasformanti su terreno DSM, che induce la sporulazione, in presenza di

X-gal, substrato cromogenico per la β -galattosidasi. Su tali piastre, le colonie contenenti le fusioni trascrizionali assumevano una colorazione azzurra dovuta all'idrolisi del substrato, indicando che la fusione era funzionante. Il ceppi ricombinanti così ottenuti venivano chiamati rispettivamente AZ528 e AZ530 (figura 15).

Per analizzare l'effetto dell'assenza della 5'UTR sull'espressione del gene *cotH* i due costrutti sono stati trasferiti anche in un mutante *gerE* in cui non viene espresso il regolatore negativo GerE. A tale scopo il DNA cromosomale dei ceppi contenenti le fusioni al locus *amyE* è stato utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo isogenico mutato in *gerE*. I trasformanti sono stati selezionati per la resistenza al cloramfenicolo acquisita nell'evento d'integrazione della fusione sul cromosoma. I ceppi ricombinanti così ottenuti venivano rispettivamente chiamati AZ529 e AZ532.

A



B

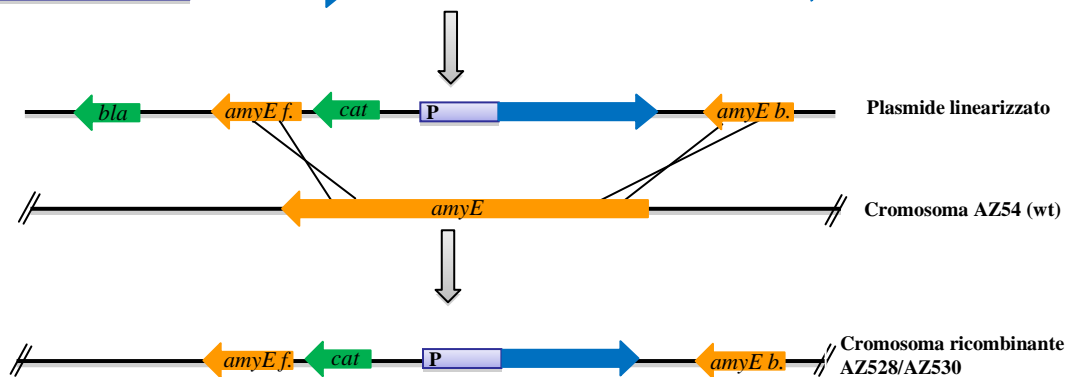
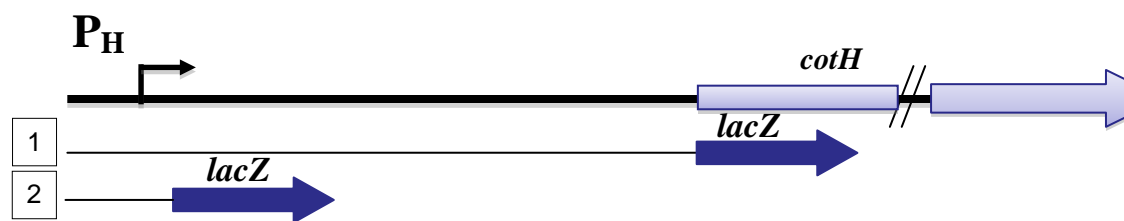


Figura 15: A) schema riassuntivo della costruzione dei plasmidi pRG10 e pRG17; B) schema d'integrazione delle fusioni al locus *amyE* del cromosoma di *B. subtilis* mediante doppio *crossing-over*.

3.1.6 Analisi delle fusioni trascrizionali *cotH::lacZ*

I ceppi ricombinanti contenenti le fusioni trascrizionali *cotH::lacZ* che differiscono per la presenza o l'assenza della regione 5'UTR, sono stati cresciuti in terreno DSM per indurre la sporulazione ed aliquote di 1 ml di cellule sono state prelevate ogni ora a partire dall'inizio del processo di sporulazione (T_0) che coincide con l'inizio della fase stazionaria di crescita. Per misurare l'attività β -galattosidasica veniva utilizzato il metodo di Miller (Miller, 1972), come descritto in Materiali e Metodi. Come si evince dai grafici (figura 16), entrambi i ceppi wt presentano lo stesso andamento dell'attività β -galattosidasica che inizia 4 ore dopo l'inizio della sporulazione (T_4), raggiungendo il livello massimo un'ora dopo (T_5), per poi decrescere. L'assenza di GerE determina un aumento dell'espressione del gene sia in presenza (●) che in assenza della 5'UTR (■) e anche in questo caso l'andamento dell'attività enzimatica nei due casi è sovrapponibile.

A

Fusioni trascrizionali

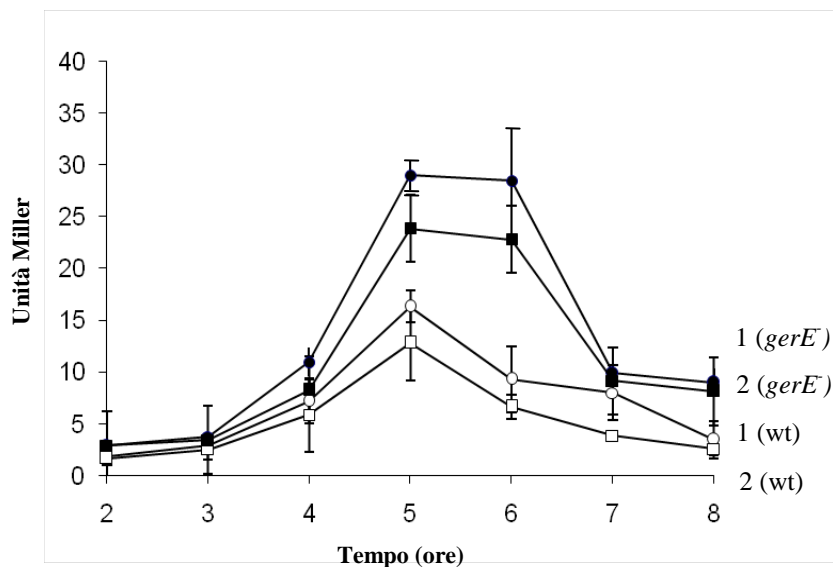
B

Figura 16: **A)** mappa schematica delle fusioni trascrizionali integrate al locus *amyE* dei ceppi AZ528 (fusione 1) e AZ530 (fusione 2). **B)** analisi dell'attività β -galattosidasi durante la sporulazione nei ceppi wt (\circ) e *gerE* (\bullet) contenenti la fusione 1, e nei ceppi wt (\square) e *gerE* (\blacksquare) contenenti la fusione 2.

Questo risultato mi permette di concludere che: i) il promotore da me individuato contiene tutte le sequenze necessarie per la normale espressione del gene *cotH*; ii) l'assenza della 5'UTR non influenza l'espressione del gene a valle nelle condizioni analizzate.

3.2 Analisi della funzione della 5'UTR sulla traduzione della proteina CotH

I risultati finora mostrati indicano che il gene *cotH* presenta una sequenza di 811 bp a monte di quella codificante, la cui funzione non è stata ancora identificata. È noto dalla letteratura che le regioni localizzate al 5' di trascritti batterici e non tradotte (5'UTR) possono essere coinvolte in meccanismi regolativi noti come *riboswitches*, basati sulla formazione di strutture secondarie sull'RNA che influenzano la disponibilità della Shine-Dalgarno e quindi l'efficienza di traduzione. Effettuando un'analisi bioinformatica della 5'UTR di *cotH* con il programma *RNAfold Web Server* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) si osserva che la sequenza può effettivamente formare potenziali

strutture secondarie che coinvolgono anche la sequenza Shine-Dalgarno (figura 17). Sebbene in *B. subtilis* gli elementi responsabili del *riboswitch* abbiano una lunghezza media di circa 360 bp (Irnov *et al.*, 2010), non posso escludere la possibilità che anche nel caso di *cotH*, la 5'UTR, pur essendo molto estesa, possa avere un ruolo regolativo sulla sintesi della proteina CotH. Ho deciso quindi di costruire un ceppo di *B. subtilis* recante una copia del gene *cotH* (chiamata *cotHΔ*) che conservava solo il promotore e la regione codificante, eliminando quindi la porzione centrale, trascritta e non tradotta. Tale ceppo sarà analizzato per valutare la sintesi e l'assemblaggio della proteina CotH durante la sporulazione in confronto ad un ceppo selvatico.



Figura 17: struttura secondaria della regione 5'UTR del gene *cotH*, ottenuta con il programma *RNAfold Web Server*. È indicato: il sito d'inizio della trascrizione (+1), la sequenza di Shine-Dalgarno (RBS) e il codone d'inizio (AUG).

3.2.1 Costruzione della delezione

Lo scopo dell'esperimento era quello di costruire un ceppo contenente il gene *cotH* che conservava il promotore e la sequenza SD perdendo quasi tutta la regione 5'UTR (figura 19A). Per ottenere il costrutto genico ho utilizzato la tecnica detta “Gene Splicing by Overlap Extension” (Gene SOEing) che permette, mediante l'utilizzo della PCR, di ottenere la fusione di due frammenti di DNA amplificati separatamente. Per ottenere la delezione interna alla 5'UTR, venivano amplificati, dal DNA cromosomale di un ceppo selvatico di *B. subtilis*, due frammenti di diversa lunghezza: il primo, contenente la regione promotrice fino al +1, ottenuto con l'utilizzo degli oligonucleotidi Del3/H33s (340 bp); il secondo, contenente una sequenza che si estende da 34 bp a monte dell'ATG (comprendente la SD) fino a parte della sequenza codificante, ottenuto con gli oligonucleotidi H32s/H13 (850 bp). Poiché gli oligonucleotidi interni, H33s e H32s, erano disegnati in modo da avere estremità 5' complementari tra loro, la

tecnica consentiva di unire poi i due frammenti ottenuti dalla PCR (anch'essi complementari tra loro) escludendo così la regione tra essi compresa (figura 18). A tale scopo i prodotti ottenuti dalle due reazioni di PCR venivano quantificati su gel di agarosio e purificati. Un'aliquota corrispondente a 30 ng di ciascun frammento veniva amplificata utilizzando soltanto i rispettivi oligonucleotidi esterni, Del3 e H13. Con queste amplificazioni si ottenevano due frammenti complementari tra loro che venivano quindi miscelati e sottoposti ad un programma di PCR di 20 cicli. Al termine di tale procedura veniva ottenuto un unico prodotto di circa 1190 bp derivato dalla fusione dei due frammenti inizialmente amplificati.

Il prodotto di fusione veniva clonato in pGemT-easy, controllato mediante sequenziamento e, successivamente, subclonato nel vettore pER19 contenente una cassetta per la resistenza al cloramfenicolo selezionabile in *B.subtilis*.

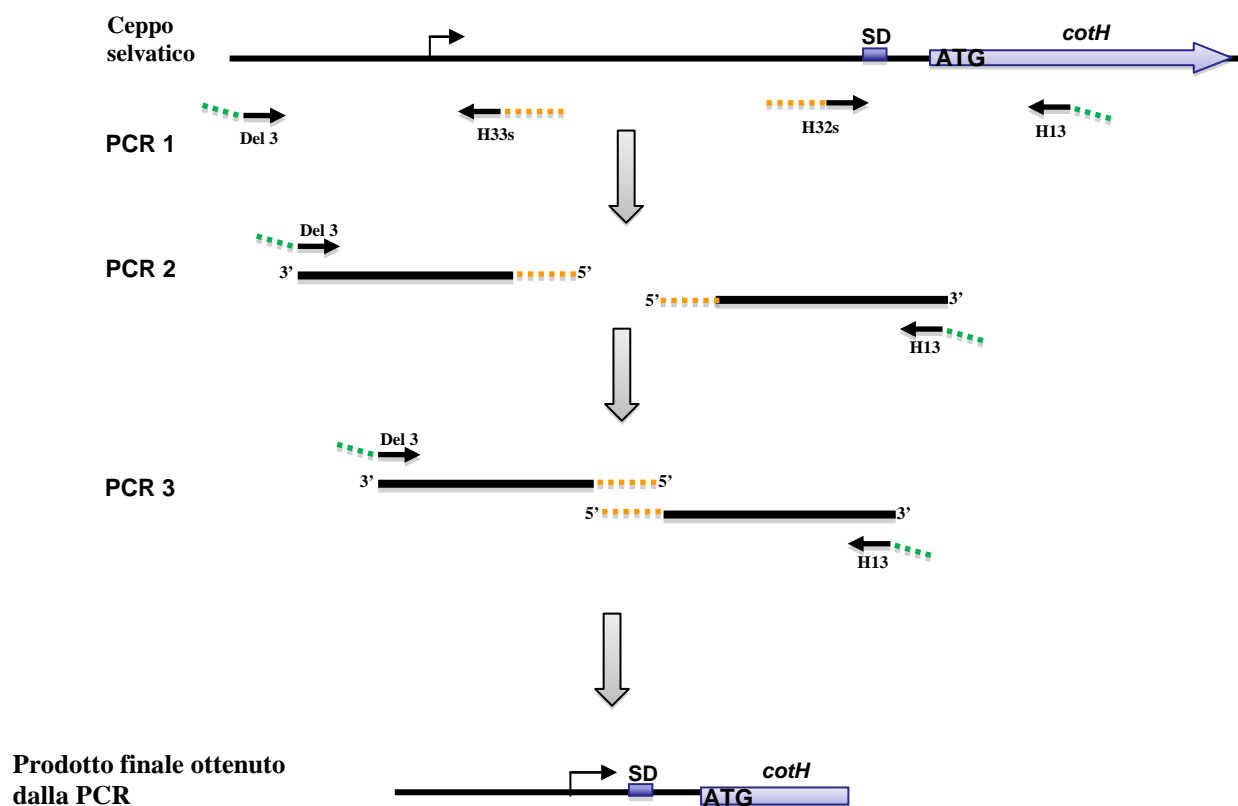


Figura 18: schema della tecnica del *gene SOEing*. Sono riportati gli oligonucleotidi utilizzati (freccie nere). La regione di complementarietà tra gli oligonucleotidi interni è indicata in arancio.

Il plasmide ricombinante così ottenuto, pRG25, conteneva, quindi, il gene *cotH* interrotto (in quanto esteso fino all'oligo H13) e mancante di quasi tutta la sequenza 5'UTR (figura 19).

3.2.2 Integrazione in *Bacillus subtilis*

Il plasmide contenente il gene *cotHΔ* (con la delezione interna della 5'UTR) veniva utilizzato, in forma circolare, per trasformare cellule competenti di un ceppo selvatico di *B. subtilis*. I trasformanti ottenuti dopo selezione con l'antibiotico cloramfenicolo, erano il risultato di un singolo evento di ricombinazione (tipo *Campbell*) avvenuto a livello delle regioni di omologia presenti sia sul plasmide sia sul cromosoma (figura 19 B). Poiché sul plasmide la sequenza codificante per CotH è trunca, l'evento d'integrazione comporta l'interruzione della copia selvatica del gene *cotH*. Di conseguenza l'unica copia del gene *cotH* integra è quella con la delezione della 5'UTR.

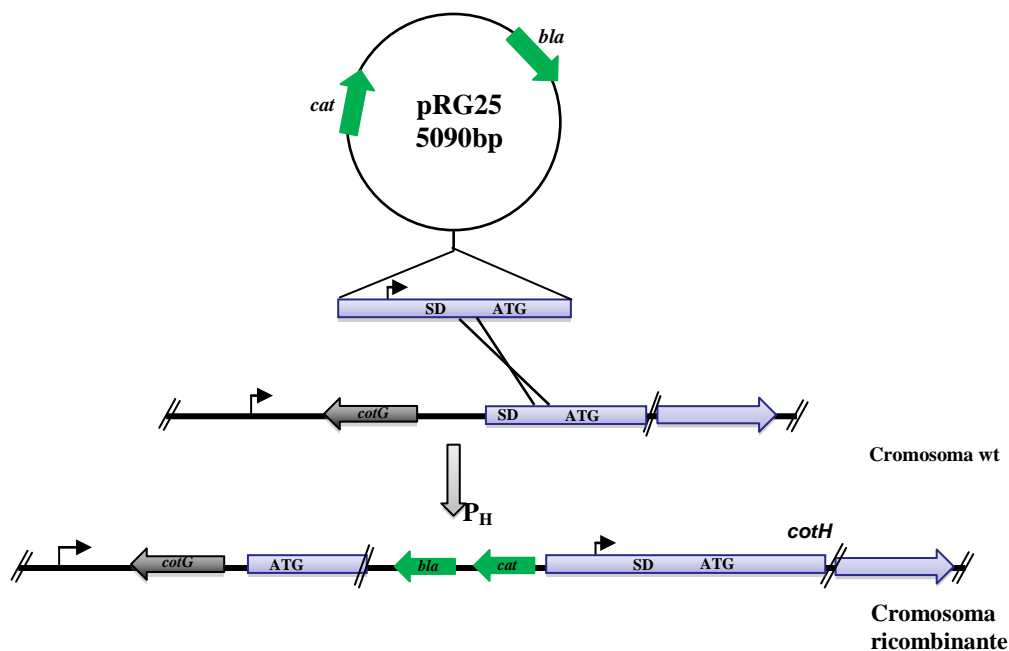


Figura 19: A) rappresentazione schematica del gene *cotH* wt e *cotH* Δ ; B) schema di integrazione per singolo *crossing-over* (tipo *Campbell*) del plasmide pRG25 nel cromosoma di *B. subtilis*.

La presenza della delezione e la correttezza dell'integrazione sul cromosoma nei ceppi ricombinanti ottenuti, veniva verificata mediante PCR ed il ceppo di *B.subtilis* contenente l'allele mutato del gene *cotH* veniva denominato *cotHΔ* (alias AZ535).

3.2.3 Analisi strutturale delle spore mutanti *cotHΔ* mediante SDS-PAGE e *Western blot*

Per studiare l'effetto della delezione della regione 5'UTR del gene *cotH* sulla sintesi della proteina e sul suo assemblaggio sulla tunica sporale, ho confrontato il *pattern* di sintesi ed assemblaggio di CotH durante la sporulazione in un ceppo selvatico e nel mutante *cotHΔ*. A tale scopo ho cresciuto i due ceppi in *growth medium* fino alla tarda fase esponenziale e successivamente li ho centrifugati e risospesi in *resuspension medium* in modo tale da indurre la sporulazione (Materiali e Metodi). Ho quindi purificato le spore a vari tempi dall'inizio della sporulazione (T6, T8, T15) fino alla formazione delle

spore mature (T30). Le proteine della tunica sono state estratte mediante trattamento con SDS e quantificate mediante il saggio di Bradford. Una quantità di proteina pari a 20 γ di ogni campione è stata frazionata su gel denaturante di poliacrilammide al 12% in presenza di un marcatore di peso molecolare noto. Dopo la migrazione le proteine sono state elettrotrasferite su una membrana di nitrocellulosa, mentre il gel è stato sottoposto a colorazione con Blu di Coomassie in modo da verificare che la relativa quantità di proteine caricate dei vari campioni fosse paragonabile.

Dopo l'elettrotrasferimento, la membrana è stata incubata in presenza dell'anticorpo primario anti-CotH diluito 1:500, e successivamente incubata con l'anticorpo secondario (*anti-rabbit* coniugato con perossidasi, *Sigma*). Le proteine riconosciute dall'anticorpo sono state visualizzate con il metodo ECL (*Amersham*), seguendo le istruzioni della ditta fornitrice. Come mostrato in figura 20, la quantità di proteina CotH rilevata sulle spore dei due ceppi è sempre paragonabile, indicando che, almeno

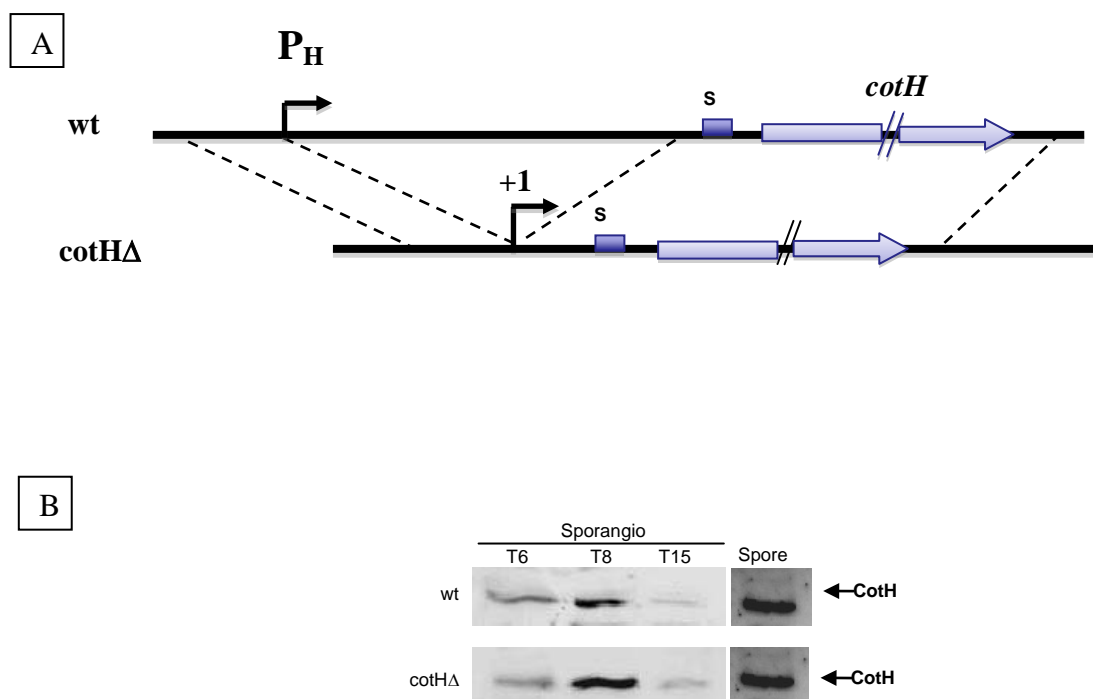


Figura 20: **A)** rappresentazione schematica del gene $cotH_{wt}$ e $cotH_{\Delta}$; **B)** western blot anti-CotH da proteine estratte dopo 6, 8, 15 e 30 dall'inizio della sporulazione dai ceppi AZ54 (wt) e AZ535 ($cotH_{\Delta}$).

in queste condizioni sperimentali, la regione al 5' dell'mRNA di *cotH* non ha effetto sulla produzione ed assemblaggio della proteina sulla spora.

3.3 Analisi del locus *cotH/cotG*

La dimensione insolita della regione 5'-UTR dell' mRNA di *cotH*, insieme alla mancanza di una funzione regolativa e alla presenza del gene divergente *cotG* tra il promotore e la regione codificante, mi hanno spinto ad analizzare più in dettaglio il locus cromosomico *cotG/cotH*. Come prima cosa mi sono chiesta se questa complessa organizzazione genica fosse conservata nei Bacilli sporigeni. A tal fine ho usato le sequenze aminoacidiche delle proteine CotH e CotG di *B. subtilis* subsp. *subtilis* str.168 (*Accession number*: NP_391488.1) come *query* per un'analisi bioinformatica con la piattaforma BLAST in modo da confrontarle con le proteine di Batteri ed Archea il cui genoma è stato completamente sequenziato. La scansione di 1006 genomi (917 da Batteri e 89 da Archaea), utilizzando i parametri di *default* senza filtri, ha

evidenziato che, mentre la proteina CotH è estremamente conservata tra tutti gli sporigeni, CotG è ristretta a poche specie, ed in particolare, quattro *Bacilli* e due *Geobacilli* (Tabella 4).

Le sei sequenze CotG hanno lunghezze differenti, che vanno da 77 (*Geobacillus* sp. WCH70) a 198 residui di aminoacidi (*B. subtilis* subsp. *spizizeni* str. W23) (Tabella 4). Dato che in tale analisi sono compresi 76 genomi di *Bacillales*, i risultati della tabella 4 suggeriscono una ristretta distribuzione filogenetica di *cotG* e di conseguenza, che l'organizzazione genica del locus riscontrata in *B.subtilis* non è diffusa tra i *Bacilli* sporigeni.

E' interessante osservare che nei 6 organismi che contengono *cotG*, il gene risulta adiacente e trascritto divergentemente rispetto all'ortologo *cotH* (figura 21). Solo in *Geobacillus* sp. WCH70 i due geni ortologhi sono separati da una ORF che codifica per una putativa trasposasi (della famiglia di proteine IS116/IS110/IS902).

Tabella 4: lista dei geni *cotG* ritrovati nei genomi completamente sequenziati

Organismo	Accession no	Evalue	Lunghezza Proteina (aa)
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain 168	NP_391488.1	4e-92	195
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> strain W23	YP_003867887.1	1e-61	198
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	YP_001422884.1	6e-31	176
<i>B. atrophaeus</i> 1942	YP_003975035.1	2e-28	174
<i>Geobacillus</i> sp. strain WCH70	YP_002950034.1	6e-05	77
<i>Geobacillus</i> sp. strain Y4.1MC1	YP_003988838.1	5e-04	183

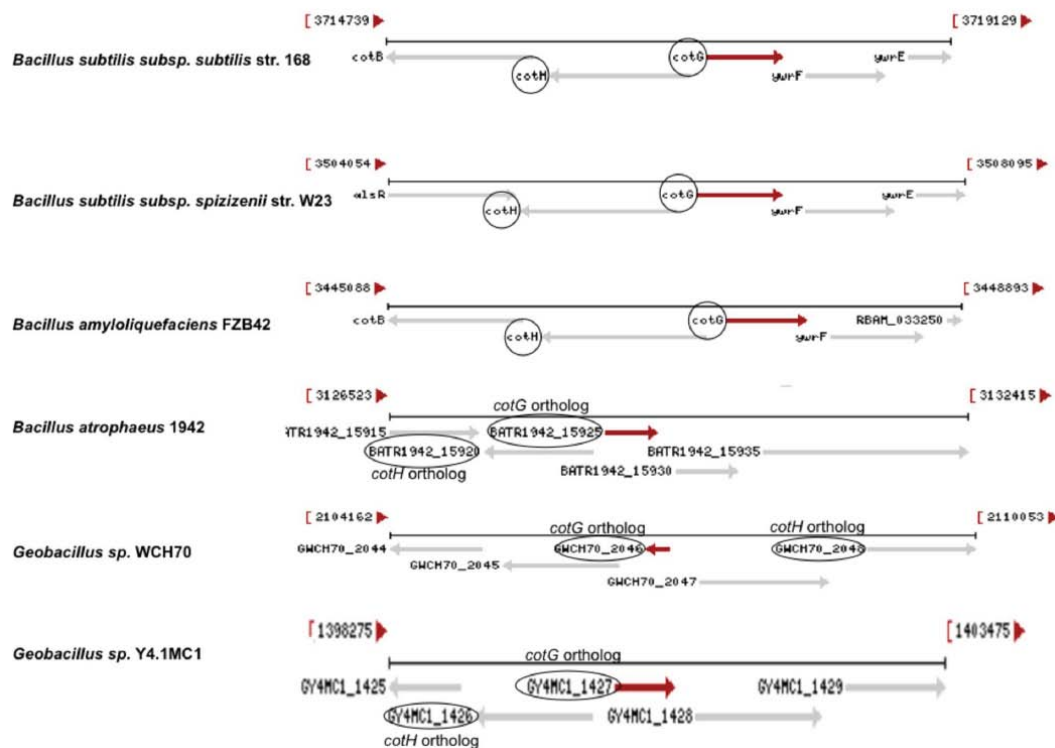


Figura 21: struttura del locus genico *cotG/cotH* nei sei organismi che possiedono CotG. La freccia rossa indica l'ortologo *cotG* che risulta sempre divergente rispetto all'ortologo *cotH*.

Mi sono quindi chiesta se anche da un punto di vista trascrizionale fosse mantenuta la stessa organizzazione genica osservata in *B. subtilis*. A tale scopo ho effettuato un esperimento di RT-PCR su RNA estratti dagli altri 3 Bacilli contenenti *cotG* quali, *B.amyloliquefaciens* FZB42, *B. atrophaeus* 1942 e *B. spizizenii* W23 che mi sono stati forniti dal *Bacillus Genetic Stock Center*. Non mi è stato possibile effettuare la stessa analisi nei due *Geobacillus* in quanto i ceppi non sono disponibili.

Gli RNA sono stati estratti dopo 5 ore dall'inizio della sporulazione e purificati utilizzando un kit commerciale (*Qiagen*).

Un'aliquota di circa 2 µg di RNA veniva sottoposta a retro-trascrizione utilizzando l'oligonucleotide H1, localizzato nella sequenza codificante del gene *cotH* e diretto verso l'estremità 5' del gene. Successivamente, il cDNA ottenuto veniva amplificato per PCR utilizzando l'oligonucleotide H1 in coppia con l'oligonucleotide H2, che mappa a livello dell'ATG del gene *cotH*, e H3, localizzato a valle del gene *cotG* (figura 22A).

Il risultato della PCR veniva visualizzato dopo migrazione dei campioni su gel di agarosio al 1% e l'eventuale presenza di un prodotto di amplificazione era dovuta all'amplificazione del cDNA prodotto durante la reazione di retrotrascrizione.

Per controllo, la stessa reazione di PCR veniva effettuata anche sui campioni di RNA trattati con DNasi ma non sottoposti a retro-trascrizione (C-) e che, in assenza di contaminazione di DNA cromosomale, non danno alcun prodotto di amplificazione. Parallele reazioni di PCR venivano effettuate come controllo positivo dell'esperimento usando come stampo il DNA cromosomale (C+).

Come mostrato in figura 22B, prodotti di amplificazione della grandezza attesa venivano osservati con entrambe le coppie di oligonucleotidi (H1/H2 e H1/H3) indicando che anche in queste specie il promotore del gene *cotH* è distante dal coding ed il gene *cotG* è contenuto nella 5'UTR del gene *cotH*.

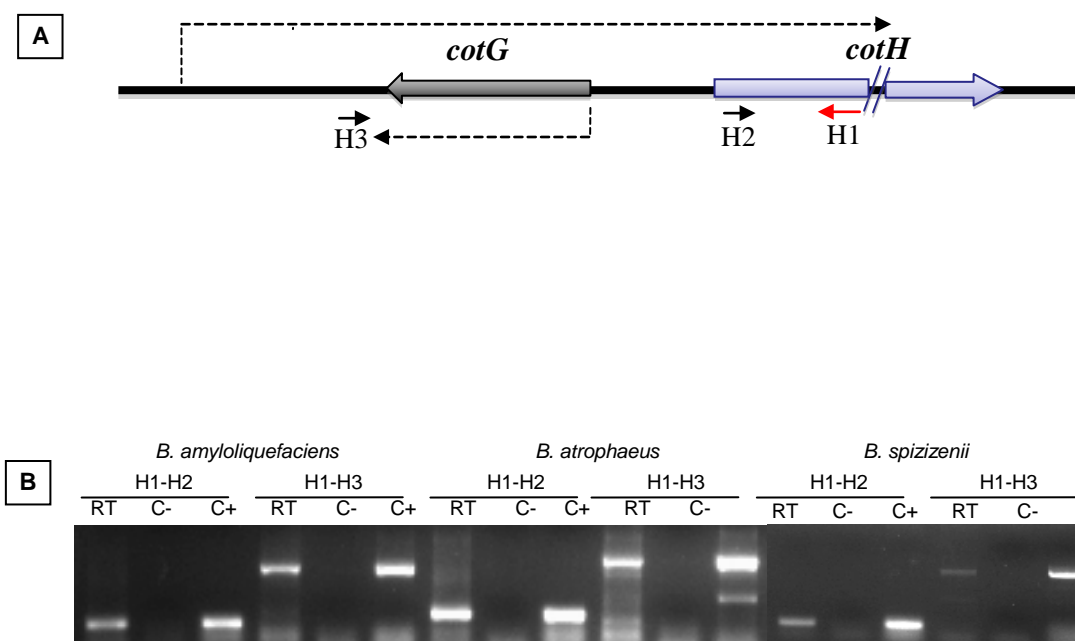


Figura 22: **A)** mappa schematica del locus *cotG/cotH*. È riportata la posizione degli oligonucleotidi utilizzati nella PCR (rispetto all'ATG del gene *cotH*) ed in rosso è indicato il primer utilizzato per la sintesi del cDNA. **B)** Fotografia del gel di agarosio in cui sono visualizzati i prodotti di PCR ottenuti con le coppie di oligonucleotidi indicate in figura e nello schema. Come stampo sono stati utilizzati: DNA cromosomale (C+); RNA non retrotrascritto (C-); cDNA ottenuto con l'oligonucleotide H (RT).

Pertanto, nelle poche specie di Bacilli in cui è presente un ortologo del gene *cotG*, l'organizzazione del locus genico *cotG/cotH* è conservata sia da un punto di vista strutturale (geni adiacenti e divergenti) che trascrizionale (gene *cotG* compreso tra il promotore ed il *coding* di *cotH*) e suggeriscono una comune origina evolutiva del locus.

3.3.1 Struttura, origine ed evoluzione del gene *cotG*

Per studiare l'origine evolutiva del gene *cotG* ho innanzitutto confrontato le sequenze aminoacidiche delle 6 proteine CotG mediante il programma ClustalW che consente di fare allineamenti multipli e comparare contemporaneamente più sequenze. L'analisi ha rivelato che la sequenza aminoacidica è più conservata nella regione N-terminale (aminoacidi 1-45) che in quella C-terminale, mentre nella porzione centrale la sequenza è molto variabile (figura 23 A). Se lo stesso tipo di analisi viene effettuata considerando solo le sequenze dei Bacilli, il grado di conservazione aumenta e si estende

B. subtilis subsp. *subtilis* str. 168
B. subtilis subsp. *spizizenii* str. W23
B. amyloliquefaciens FZB42
B. atrophaeus 1942
Geobacillus sp. WCH70
Geobacillus sp. Y4.1MC1

-----KKSRSYKKSRSYKKSYSCHHKKRSYKKS3CRTHKKSYSRSHKKYKYP-----
-----SRYSKKSYSCHHK-----SRYSKKSYSRYSKKSYSKKSCHRTHKKSYSCHHKKKSHK-----
-----RKKSRSHKSHKSRSHKSHKSRCKKKRKTQKKPQPKQ-----
-----KRSYKKSFCSHHKKRSRHKKSYSRHHKFCFSRKSRS-----
-----HSHRSTSCFRP-----
G-----TSRSGRTDRTGRTSRSSGTRSRSRHTHTHNHASSHSRTHRS-----

```

-----HHHCDDYKRHHDDYSKKEYWKDGNWVVKKKYK-
KYYKPPHHHHHKKEDDYHSKKEFWKDGNCWVVKKKYK-
-----DPCCKEDDYCSKTEWKDGNIVVKKKNYK-
-----YKKDYYSKKEFWKDGNVWTVVKKKYK-
-----R-----RKRRYWRDNNMHTLWLEDD
-----RRTKYFKRKRYWNGNIMMLWLW--
          *  *  *  *

```

B

B. subtilis subsp. *subtilis* str. 168
B. subtilis subsp. *spizizenii* str. W23
B. amyloliquefaciens FZB42
B. atrophaeus 1942

```

-----HDDYDSKKEYWKDGNVWVKKKYK
SYCSHKKKSHKKYYPKPHHHHHYKKEDDYSHKKEFWKDGNVWVKKKYK
P-----CKKDDYCSKTEYWKDGNIIWVVKKNYK
-----YKKDDYYYSKKEFWKDGNVWTVKKKYK
          * * * * *

```

anche alla porzione centrale della proteina (figura 23 B). E' interessante osservare che proprio questa regione ha una peculiare struttura aminoacidica che, come già riportato in letteratura (Sacco *et al.*, 1995), consta di 9 ripetizioni di 13 amonoacidi ciascuna. Un'analisi più approfondita, effettuata in collaborazione col professore Fani dell'Università di Firenze, esperto di evoluzione di genomi microbici, indica che in realtà questa regione ripetuta ha una organizzazione più complessa rispetto a quanto già osservato in precedenza.

In particolare, come mostrato in figura 24, è possibile identificare 7 ripetizioni in tandem ognuna costituita da due moduli di 7 e 6 aminoacidi, rispettivamente. Le 7 ripetizioni sono poi seguite da 5 ripetizioni di 7 aminoacidi. Tale struttura modulare si riscontra anche a livello della sequenza nucleotidica in cui si evidenziano 12 sequenze ripetute di 21 basi, e 7 sequenze di 18 basi (figura 24), codificanti rispettivamente per i moduli di 7 e 6 aminoacidi.

Questa peculiare struttura modulare suggerisce che da un punto di vista evolutivo, il gene sia il risultato di una serie di eventi di allungamento genico a partire da un unico modulo ancestrale. L'allungamento genico è uno dei meccanismi alla base dell'evoluzione dei genomi microbici e consiste nella duplicazione di un gene o di porzioni di esso che comportano il progressivo allungamento della sequenza nucleotidica (Fani *et al.*, 2007, 2009). Nel caso di *cotG*, il percorso evolutivo più probabile può essere dedotto dall'analisi del numero di discrepanze esistenti tra i diversi moduli, assumendo che l'evoluzione del gene abbia seguito la via più "parsimoniosa" per arrivare alla situazione attuale. Come mostrato nelle tabelle 5 e 6 la maggior parte delle mutazioni cadono nei moduli da 21 basi (n°1-3-5-7-9-11-13-15-16-17-18-19), mentre i sette moduli da 18 basi (n°2-4-6-8-10-12-14) restano quasi invariati. Inoltre, paragonando i moduli che si susseguono in tandem (modulo 1-2 rispetto al 3-4 e 3-4 rispetto al 5-6, e così via), la divergenza tra le sequenze è molto bassa.

Tabella 5: Numero di mutazioni tra i diversi moduli del gene *cotG* di *B. subtilis* 168

Moduli	N° delle mutazioni nei moduli											
	1	3	5	7	9	11	13	15	16	17	18	19
1	—	5	7	7	5	6	7	5	11	6	8	11
3		—	4	2	2	3	2	4	10	5	7	8
5			—	2	2	3	2	4	9	8	6	11
7				—	1	1	2	3	10	6	7	9
9					—	3	2	4	12	7	5	9
11						—	0	2	12	5	5	9
13							—	2	13	4	8	10
15								—		6	6	11
16									—	10	8	9
17										—	10	10
18											—	10
19												—

Moduli	N° delle mutazioni nei moduli						
	2	4	6	8	10	12	14
2	—	1	0	0	1	0	0
4		—	0	0	1	0	0
6			—	0	1	0	0
8				—	1	0	0
10					—	1	1
12						—	0
14							—

Tabella 6: Numero di mutazioni tra coppie dei moduli del gene *cotG* di *B. subtilis* 168

Coppie di moduli	N° delle mutazioni nelle coppie di moduli					
	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14
1-2	6	7	7	6	6	7
3-4	—	4	2	3	3	2
5-6		—	2	3	3	2
7-8			—	2	1	2
9-10				—	4	3
11-12					—	0
13-14						—

Pertanto, sulla base di questi dati (tabelle 5 e 6) si possono ipotizzare due alternative. La prima prevede che un modulo ancestrale di 21 bp (modulo 1 in figura 25) abbia generato per allungamento genico, un altro modulo da 21 bp il quale, a causa della divergenza evolutiva, è andato incontro alla eliminazione di una tripletta e alla modifica di alcune basi dando origine al modulo 2 (figura 25); In alternativa, il modulo ancestrale era di 18 bp (modulo 2 in figura 25) e l'allungamento genico ha generato un altro modulo da 18 nucleotidi che successivamente divergeva per l'acquisizione di una tripletta (modulo 1 in figura 25).

In entrambi i casi il fenomeno porta alla formazione del primo modulo tandem di 39 basi (1-2) da cui avrebbero avuto origine tutti gli altri per duplicazione e divergenza. In particolare il modulo 1-2 ha generato il modulo 3-4 che differisce dal primo solo per sei basi (5 sostituzioni tra i moduli 1 e 3 e 1 sostituzione tra il modulo 2 e 4).

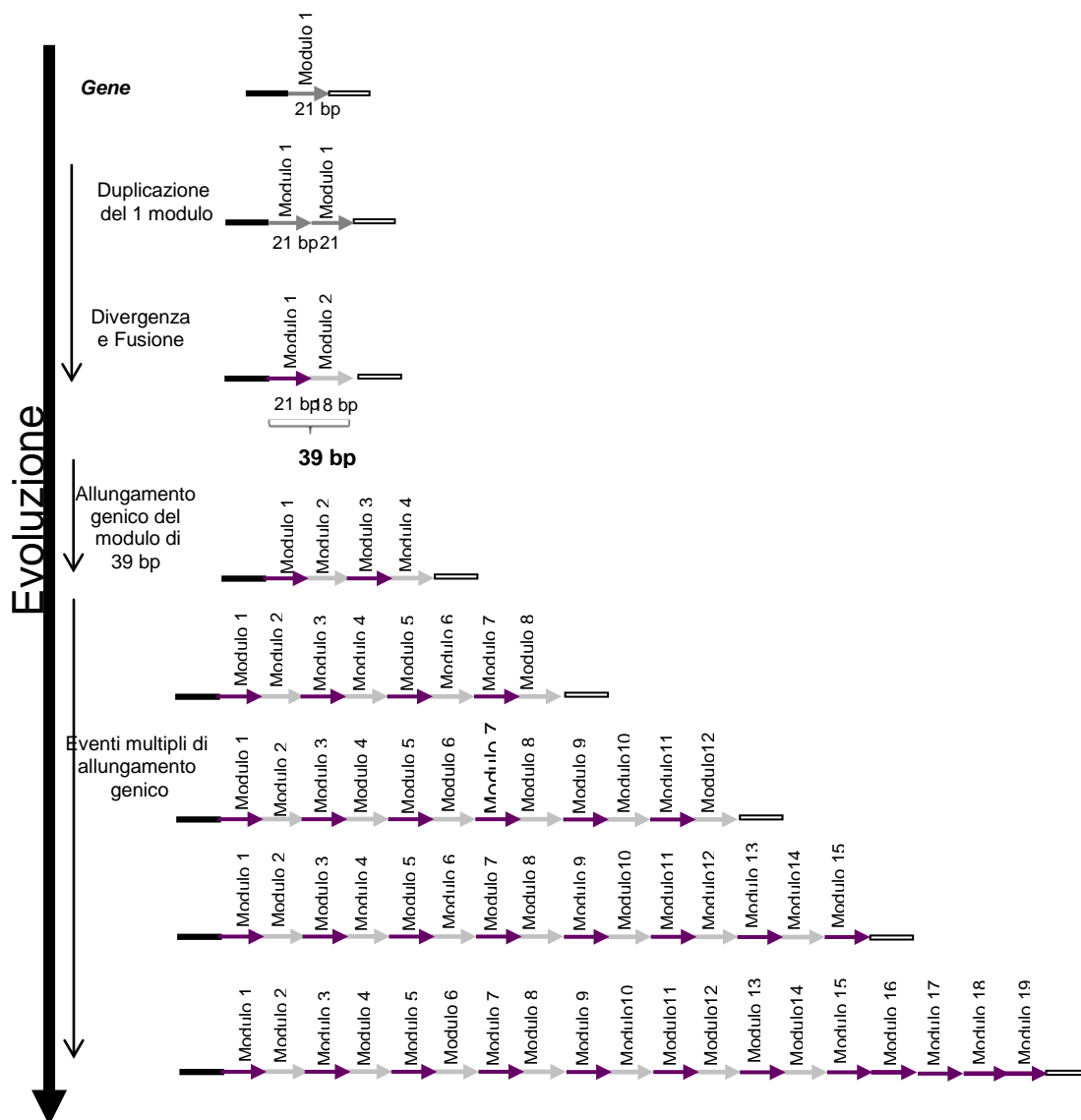


Figura 25: modello proposto per l'origine e l'evoluzione di *cotG* di *B. subtilis*, considerando il modulo da 21 basi come sequenza ancestrale.

Successivamente, anche il nuovo modulo da 39 basi è andato incontro ad un fenomeno di allungamento genico dando origine al *tandem* 5-6 e così via, fino alla formazione dei primi 14 moduli. L'ultima parte della regione ripetuta, costituita da 5 ripetizioni di 21 basi, potrebbe derivare dalla duplicazione di 1 o più moduli da 21 basi (figura 25). Anche se gli ultimi 5 moduli sono i più divergenti, restano comunque visibili le tracce di una comune origine evolutiva.

Una simile ipotesi evolutiva proposta per il gene *cotG* di *B. subtilis* può essere estesa anche per le altre 5 specie che contengono il gene ortologo, poiché in tutti i casi la proteina conserva una struttura modulare. E' interessante però osservare che nelle 6 specie il numero, la lunghezza e, in alcuni casi, la sequenza dei moduli, sono molto variabili. In particolare, nei *Bacilli* la proteina è simile a quella di *B. subtilis* come sequenza anche se il numero e la lunghezza dei moduli varia nelle diverse specie (figura 26 A).

A	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> W23	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>B. atrophaeus</i> 1942
	SHKKSHR SHKKSR SHKKSYC SHKKSR SHKKSYC SHKKSR SYKKSYC SHKKSR SYKKSYC SHKKSR SYKKSYC SHKKSR SYKKSYC SHKKSR SYKKSYR SYKKYR SYKKSCR THKKSYC SHKKK SHKKYYK	KHKKS SHKKSR SHKKSCR SHKKSR SHKKSCR SHKKSR SHKKSR SHKKSR SHKKSR SHKKSR SHKKSR SHKKSR SHKKSR SHKKSR SHKKSR SHKKSCR SHKKSCR SHKKSCR SHKKSCR SHKKSCR SHKKSCR	SHKKSYC SHKKSR SHKKSN SYKKSR SHKKSYC SHKKSR SHKKSF SHKKSR SYKKSYR SHKKSR SYKKSF SHKKSR SYKKSF SHKKSR SYKKSF SHKKSR SHKKSYR SHKKSF SHKKSF SHKKSF SHKKSYR

B	<i>Geobacillus</i> WCH70		
	1 MSVYTQDDIQAVKELETEGLEDFLYQEPV	GRKHSSGRKHSSGRKHSS	HRTSCFRPRKRKRYWRDNGNMHTLWLELDD 77

C	<i>Geobacillus</i> Y4.1MC1	
	1 MRTYTHDDIQNAVIEMESGGLSGFLYQEPTGNKSKKHRSHHKRRTGY	TSHSRSTNRSRQTQRTSRTSGASRSGRTDRTGRTSRSSGTSRSHRTHHT
	97 TSHTSRSRSTNRSRQTQRTGRTSGTSRSGRTDRTGRTSRSSGTSRSHRTHHT	THASHSHRTHRSRRTKYFKRKKRYWDNGNMIMLWLG 1

Figura 26: A) sequenza dei moduli ripetuti identificati nella porzione centrale della proteina CotG di *B. spizizenii*, *B. amyloliquefaciens* e *B. atrophaeus*. B) sequenza aminoacidica della proteina CotG di *Geobacillus* WCH70 in cui sono evidenziati 3 moduli ripetuti di 6 aminoacidi nella regione centrale; C) sequenza aminoacidica della proteina CotG di *Geobacillus* Y4.1MC1 in cui sono evidenziati i 2 moduli di 49 aminoacidi quasi identici nella regione centrale.

Questa osservazione suggerisce che, probabilmente, a partire da un comune gene ancestrale, si siano verificati eventi di allungamento genico diversi che hanno dato origine alle situazioni attualmente esistenti. Anche nei due *Geobacilli* si riscontra una regione modulare nella parte centrale della proteina, ma i moduli non presentano alcuna omologia con quelli di *B. subtilis*. Inoltre in *Geobacillus* WCH70 la proteina è molto piccola (77aa) e contiene 3 moduli ripetuti (figura 26 B), mentre in *Geobacillus* Y4.1MC1 CotG consta di 183 aminoacidi e contiene 2 ripetizioni quasi identiche di 49 aminoacidi (figura 26 C).

Anche se questi moduli hanno una struttura primaria totalmente diversa da quella presente nei *Bacilli*, è probabile che anche in questo caso si siano verificati eventi allungamento genico durante l'evoluzione per originare l'ortologo esistente *cotG*.

3.4 Costruzione e analisi del mutante *cotG*⁻

I dati finora mostrati indicano che il gene *cotG* è interamente sovrapposto al gene *cotH* e pertanto la sua inattivazione comporta di conseguenza anche l'inattivazione di *cotH*. Allo scopo di chiarire la funzione della proteina CotG nella formazione della tunica sporale mi sono proposta innanzitutto di costruire un singolo mutante *cotG*⁻ in cui la funzionalità del gene *cotH* non fosse in alcun modo alterata. A tale scopo ho costruito il locus genico *cotG/cotH* che conteneva una singola mutazione nel *coding* del gene *cotG* che comportava la formazione di un codone di stop precoce.

Tale costrutto è stato inserito in un ceppo di *B. subtilis* in cui il locus selvatico *cotG/cotH* era stato completamente deletato. L'intera strategia di clonaggio che ho seguito può essere così schematizzata:

- 1) Delezione del locus genico *cotG/cotH*.
- 2) Costruzione del locus *cotGstop/cotH*, contenente una copia mutata del gene *cotG*.
- 3) Trasferimento del costrutto *cotGstop/cotH* nel ceppo

deleto del locus selvatico.

3.4.1 Delezione del locus genico *cotG/cotH*

La delezione del locus *cotG/cotH* è stata ottenuta mediante sostituzione dell'intera regione con una cassetta genica che porta la resistenza alla neomicina. A tale scopo ho utilizzato il vettore pBEST501 in cui ho clonato, a monte e a valle del gene per la resistenza all'antibiotico neomicina, due regioni presenti al 5' e al 3' del locus genico *cotG/cotH*.

La strategia di clonaggio consisteva in più passaggi:

a) clonaggio della regione *cotH3'*: la regione al 3' di *cotH* è stata amplificata mediante PCR utilizzando come stampo il cromosoma di un ceppo selvatico di *B. subtilis*, AZ54, e come innescio gli oligonucleotidi H29 (che presenta una sequenza per l'enzima di restrizione *PstI*), e B-anti (che possiede un sito riconosciuto dall'enzima di restrizione *HindIII*).

Il frammento amplificato di 800bp ottenuto dalla PCR (*cotH-3'*) è stato eluito dal gel d'agarosio, clonato nel

vettore pGemT-easy (*Promega*) e controllato per sequenziamento per verificare l'assenza di eventuali mutazioni nella regione amplificata, introdotte casualmente durante la reazione di amplificazione. Il frammento *cotH-3'* è stato quindi escisso dal plasmide utilizzando gli enzimi di restrizione *HindIII* e *PstI* portati dagli oligonucleotidi utilizzati nella reazione di PCR e clonato a monte della cassetta neomicina nel vettore pBEST501 anch'esso preventivamente digerito con gli stessi enzimi di restrizione (figura 27).

b) clonaggio della regione *cotH5'*: la sequenza corrispondente alla regione al 5' del gene *cotH* è stata amplificata mediante PCR utilizzando gli oligonucleotidi H30 e H18 entrambi contenenti all'estremità 5' il sito di restrizione per l'enzima *BamHI*. Il frammento di amplificazione di 640 basi ottenuto, è stato clonato nel vettore pGemT-easy (*Promega*) ottenendo il plasmide ricombinante pVS1, che è stato controllato per sequenziamento (BMR Genomics).

Il plasmide ricombinante è stato digerito con *BamHI* ed il

frammento corrispondente alla regione chiamata *cotH*-5' è stato trasferito nel vettore pVS5 da me costruito in precedenza e che, ricordo, contiene la sequenza cromosomica al 3' del gene *cotH* inserita a monte della cassetta neomicina. I cloni contenenti il plasmide ricombinante sono stati selezionati sottoponendo le colonie a una reazione di PCR con gli stessi oligonucleotidi utilizzati per amplificare la regione di interesse. Uno dei cloni positivi è stato quindi utilizzato per la preparazione del DNA plasmidico ed è stato chiamato pVS6 (figura 27). Quest'ultimo plasmide dunque presenta, a monte e a valle della cassetta genica che conferisce la resistenza all'antibiotico neomicina, le regioni localizzate, rispettivamente al 3' e al 5' del locus *cotH/cotG*. Tale plasmide è stato utilizzato per costruire il ceppo di *B. subtilis cotG⁻cotH*, per delezione dell'intero locus G/H, come descritto nel paragrafo successivo.

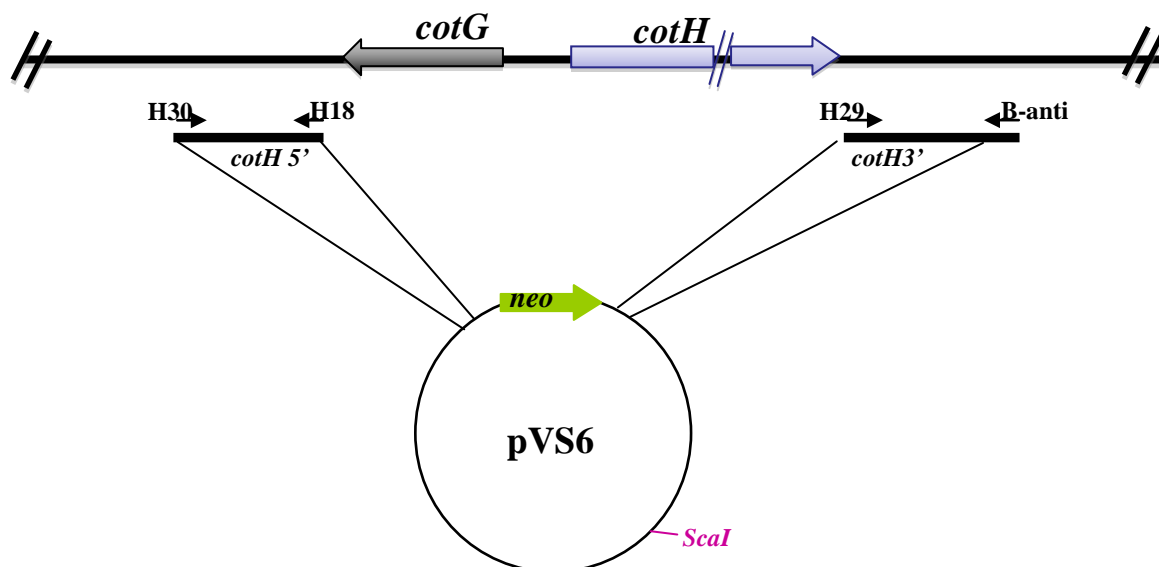


Figura 27: schema riassuntivo che riporta la strategia di clonaggio per ottenere il plasmide pSV6.

3.4.2 Costruzione del ceppo di *B. subtilis* doppio mutante *cotG*/*cotH* (G⁻H⁻)

Per ottenere la delezione dell'intero locus *cotG/cotH*, un ceppo selvatico di *B. subtilis* è stato trasformato con il plasmide pVS6 contenente le regioni presenti a monte e a valle del locus clonate ai lati del gene per la resistenza alla neomicina

Prima della trasformazione il plasmide è stato linearizzato con l'enzima *ScaI*. I trasformanti di *B. subtilis* sono stati selezionati per la resistenza alla neomicina e sono il risultato di un doppio evento di *crossing-over* avvenuto tra le regioni omologhe presenti sul plasmide e sul cromosoma (figura 28). L'effettiva delezione del locus *cotG/cotH* e la sua sostituzione con la cassetta genica per la resistenza alla *neomicina* è stata controllata mediante PCR utilizzando opportune coppie di oligonucleotidi. Il ceppo ricombinante è stato chiamato AZ603.

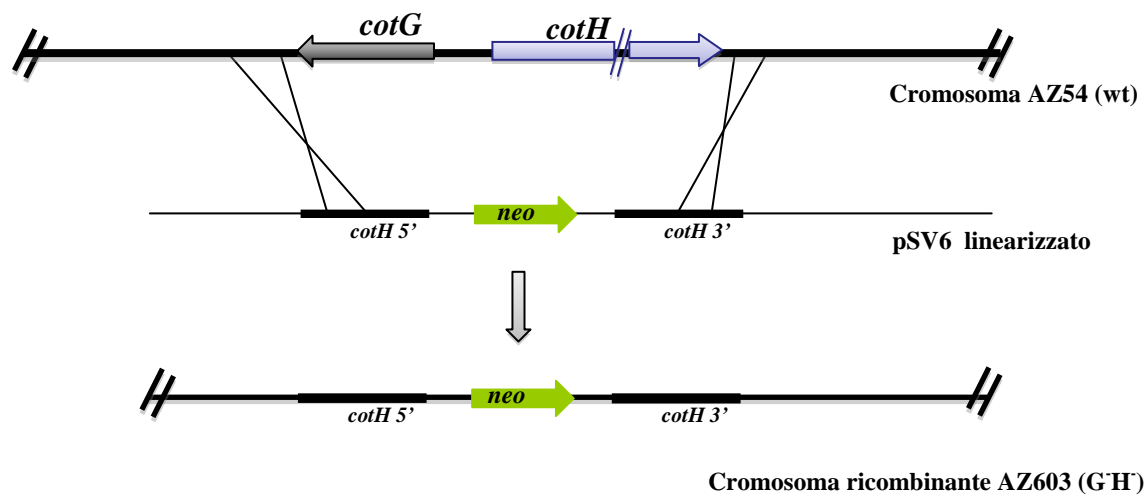


Figura 28: schema d'integrazione per doppio *crossing-over* del plasmide pSV6 nel cromosoma del ceppo selvatico di *B.subtilis*.

3.4.3 Costruzione dell'allele *cotGstop* mediante mutagenesi sito-specifica

Per mutagenizzare il gene *cotG* senza alterare l'espressione del gene *cotH* ad esso sovrapposto, ho introdotto una singola base nella sequenza codificante per *cotG* in modo tale da inserire un codone di stop precoce ed interrompere la traduzione della proteina. La strategia che ho scelto a tale scopo consiste nell'utilizzare due oligonucleotidi tra loro complementari (G-stop e G-stop-anti) ed entrambi contenenti una base in più rispetto alla sequenza selvatica del gene *cotG*. La base introdotta determina un cambiamento di *frame* e la formazione di un codone di stop (UGA) al posto dell'ottavo codone di *cotG* che normalmente codifica per l'acido aspartico (figura 29). Utilizzando la stessa tecnica del *gene SOEing*, già descritta nel paragrafo 3.2.1, ho amplificato per PCR dal DNA cromosomale di un ceppo selvatico di *B. subtilis*, due frammenti di diversa lunghezza: il primo, ottenuto con l'utilizzo degli oligonucleotidi Del5 e Gstop-anti (tabella 3), di 745bp; il secondo, ottenuto con gli oligonucleotidi Gstop e H (tabella 3), di 320bp. I prodotti

ottenuti dalle reazioni di PCR venivano purificati e 40 ng di ciascun frammento venivano separatamente amplificati utilizzando soltanto gli oligonucleotidi esterni Del5 e H.

Al termine di queste amplificazioni le due miscele di reazione venivano unite e sottoposte ad un ultimo programma di PCR di 20 cicli. Poichè i frammenti di DNA contenuti nelle due miscele avevano estremità complementari in quanto amplificati con gli oligonucleotidi complementari Gstop e Gstop-anti (figura 29), al termine di tale procedura veniva ottenuto un unico prodotto di 1037bp derivante dalla fusione dei due frammenti amplificati nella prima reazione di PCR. Il prodotto di fusione, veniva purificato da gel di agarosio e clonato nel vettore pGemT-easy. Il plasmide ricombinante così ottenuto veniva chiamato pGstop1. Per verificare la presenza della mutazione desiderata, il frammento clonato veniva sottoposto a sequenziamento.

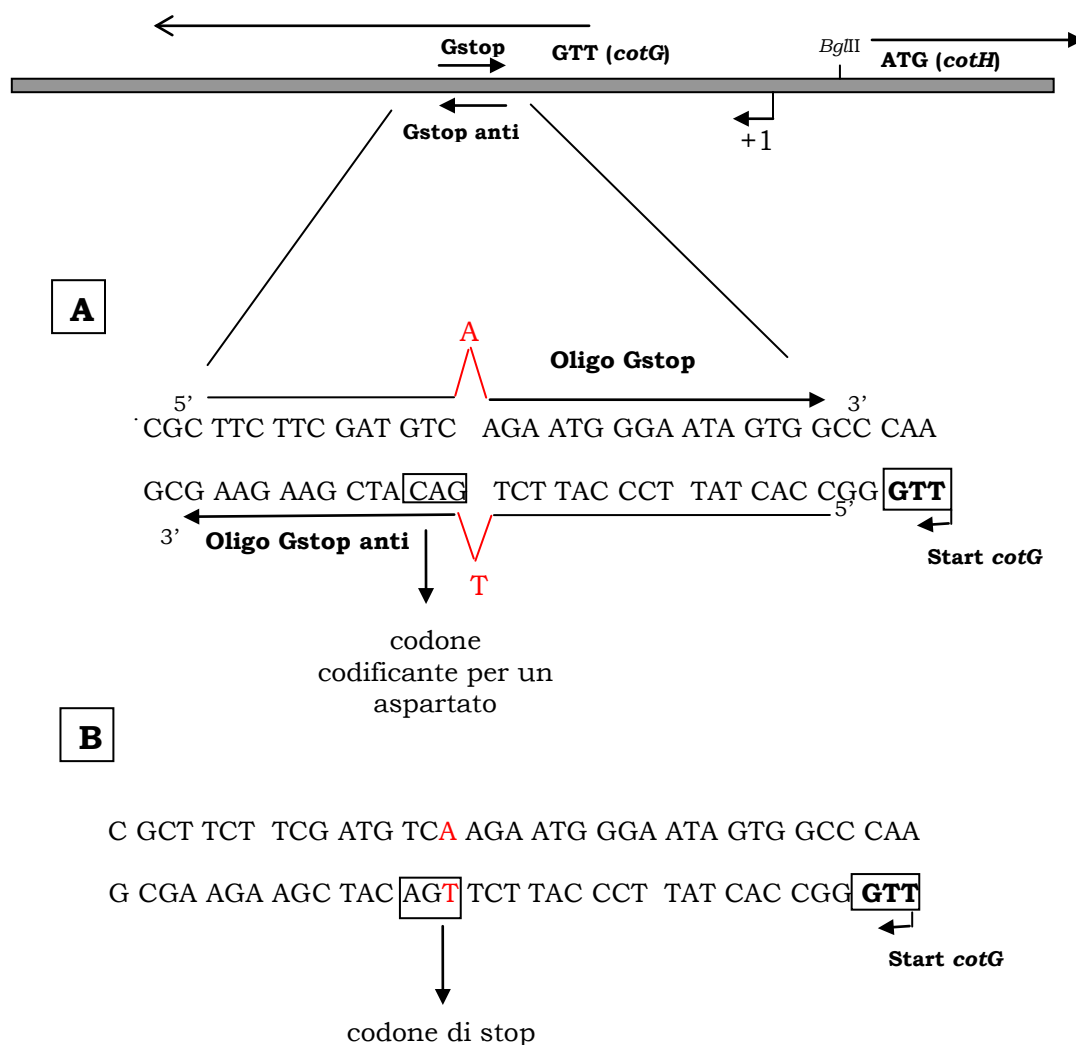


Figura 29: schema di mutagenesi sito-specifica mediante PCR. E' riportata la sequenza selvatica del gene *cotG* (**A**) e quella mutata (**B**) ottenuta mediante l'utilizzo degli oligonucleotidi G-stop e Gstop-anti indicati in figura. In rosso sono riportate le basi inserite nella sequenza selvatica e nel riquadro è evidenziato il codone di stop che deriva dalla suddetta mutazione.

Il frammento di DNA *BglIII/BamHI* di 850bp derivato dalla digestione di pGstop1 e contenente la mutazione di stop in *cotG*, veniva clonato nel sito *BglIII* di pBK2, un vettore già disponibile in laboratorio e contenente la fusione *cotH::lacZ* a partire dal sito *BglIII*, naturalmente presente nella sequenza del gene *cotH* (figura 30).

Il plasmide ricombinante ottenuto veniva chiamato pGstop2 ed utilizzato per verificare che la singola mutazione in *cotG* non avesse alcun effetto sull'espressione del gene *cotH*. A tale scopo il plasmide è stato utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo AZ603, contenente la delezione del locus *cotG/cotH* in modo tale da ottenere un ceppo contenente esclusivamente l'allele *cotG* mutato (figura 30). I trasformanti ottenuti mostravano lo stesso profilo di attività enzimatica durante la sporulazione rispetto al ceppo con la copia selvatica di *cotG* indicando che la mutazione non aveva alcuna influenza sull'espressione del gene *cotH* e che poteva pertanto essere utilizzata allo scopo di ottenere un singolo mutante in *cotG* (figura 31).

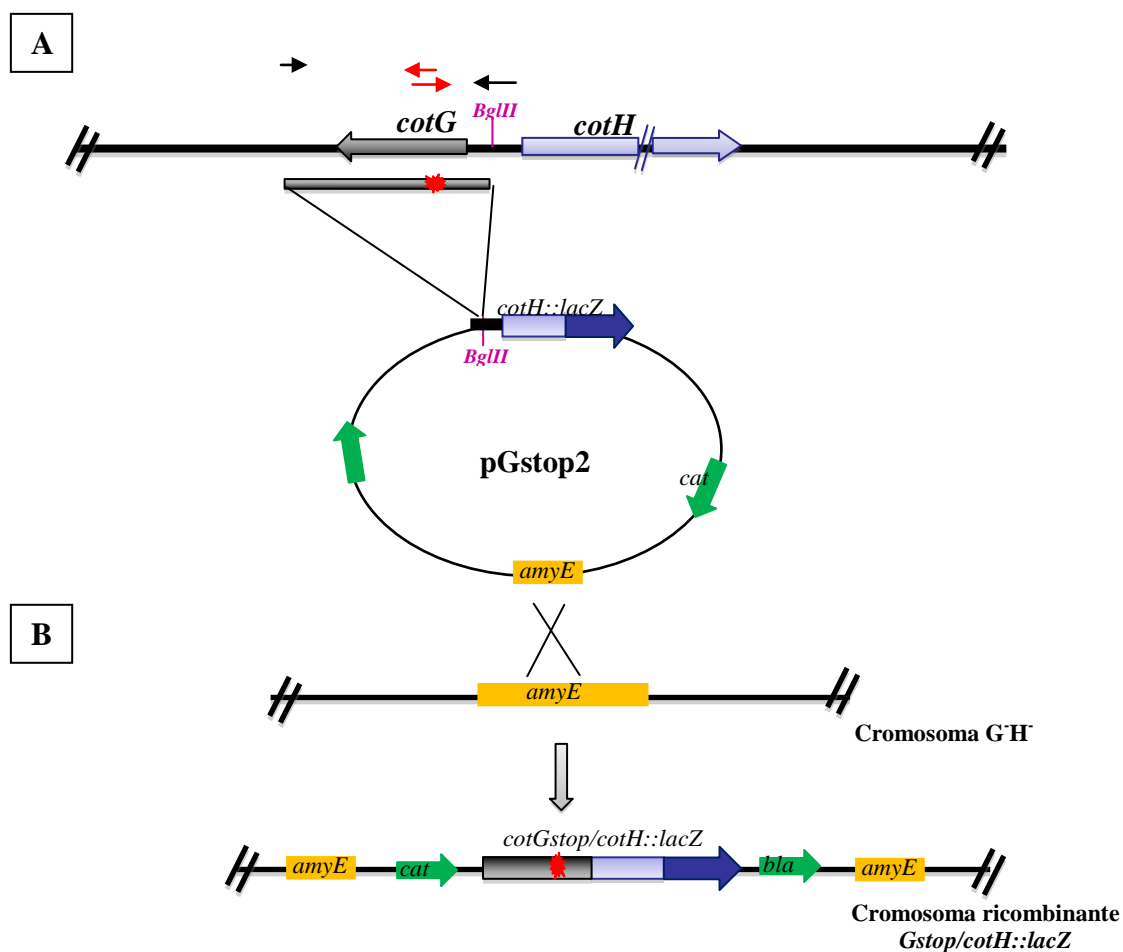


Figura 30: **A)** schema riassuntivo della costruzione del plasmide pGstop 2; **B)** schema di integrazione del plasmide per singolo *crossing-over* (tipo Campbell) nel cromosoma del ceppo AZ603 (G^-H^+). Le frecce indicano la posizione degli oligonucleotidi usati nella tecnica del gene soeing descritta nella figura precedente

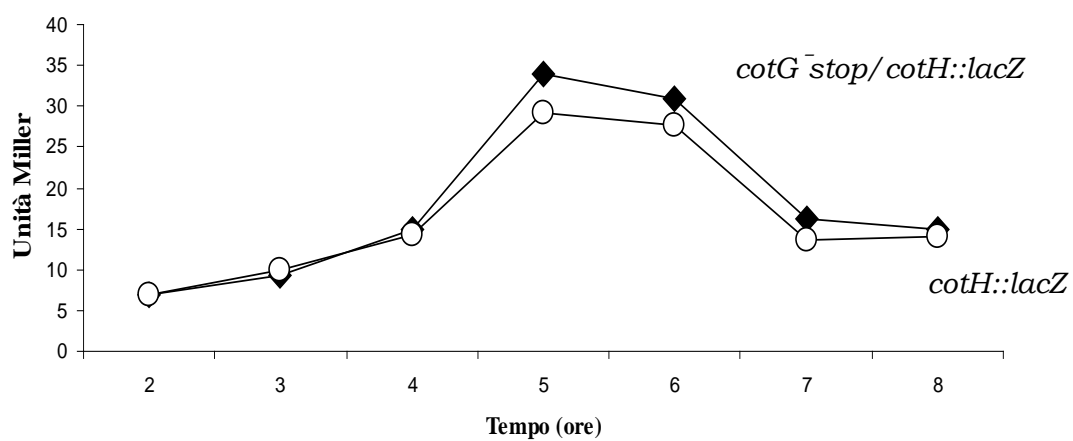


Figura 31: analisi dell'attività β -galattosidasica durante la sporulazione nei ceppi contenenti la fusione *cotH::lacZ* (○) e la fusione *cotG^{stop}/cotH::lacZ* (■).

3.4.4 Costruzione di un singolo mutante *cotG*⁻ di *Bacillus subtilis* (G⁻H⁺)

Per costruire il singolo mutante *cotG*⁻ ho digerito il plasmide pGstop2 con gli enzimi di restrizione *Bgl*III e *Sph*I, allo scopo di eliminare il gene *lacZ* e sostituirlo successivamente con il gene *cotH* ricostruendo, così, l'intero locus genico.

Il frammento genomico contenente il gene *cotH* è stato amplificato mediante reazione di PCR utilizzando come stampo il DNA cromosomale di un ceppo selvatico di *B. subtilis*, AZ54, e come innesco per la reazione due oligonucleotidi sintetici, H12anti e H28 (*Sph*I): il primo mappa a monte della sequenza codificante il gene *cotH* nella regione contenente il sito unico di restrizione *Bgl*III, mentre il secondo, mappa a valle della sequenza codificante e possiede all'estremità 5' il sito di taglio per l'enzima *Sph*I. Il frammento di 1208 bp, così ottenuto, è stato purificato dal gel d'agarosio e inizialmente clonato nel vettore pGemT-easy (*Promega*) ottenendo il plasmide ricombinante pVS3.

L'assenza di mutazioni eventualmente introdotte durante la reazione di PCR è stata controllata mediante sequenziamento.

Il plasmide pVS3 è stato quindi digerito con gli enzimi di restrizione *Bgl*III e *Sph*I ed il frammento ottenuto è stato purificato da gel di agarosio e clonato nel vettore pGEstop2 digerito con gli stessi enzimi di restrizione.

E' stato così ottenuto il plasmide pVS7 in cui il gene *lacZ* è stato sostituito con il gene *cotH* e quindi è stato ricostruito il locus *cotG*⁻/*cotH* contenente la mutazione nel gene *cotG* (figura 32). Per ottenere un ceppo di *B. subtilis* mutante *cotG*⁻, Il plasmide ricombinante pVS7 contenente il locus *cotG*_{stop}/*cotH* è stato usato per trasformare cellule competenti del ceppo G⁻H⁻, in cui l'intero locus selvatico è stato deletato. Il plasmide pVS7 deriva da un vettore specificamente utilizzato per l'inserimento di sequenze geniche nel cromosoma di *Bacillus subtilis*, in quanto, contiene la regione *amy-front* corrispondente alla sequenza al 5' del gene non essenziale *amyE* di *B. subtilis*.

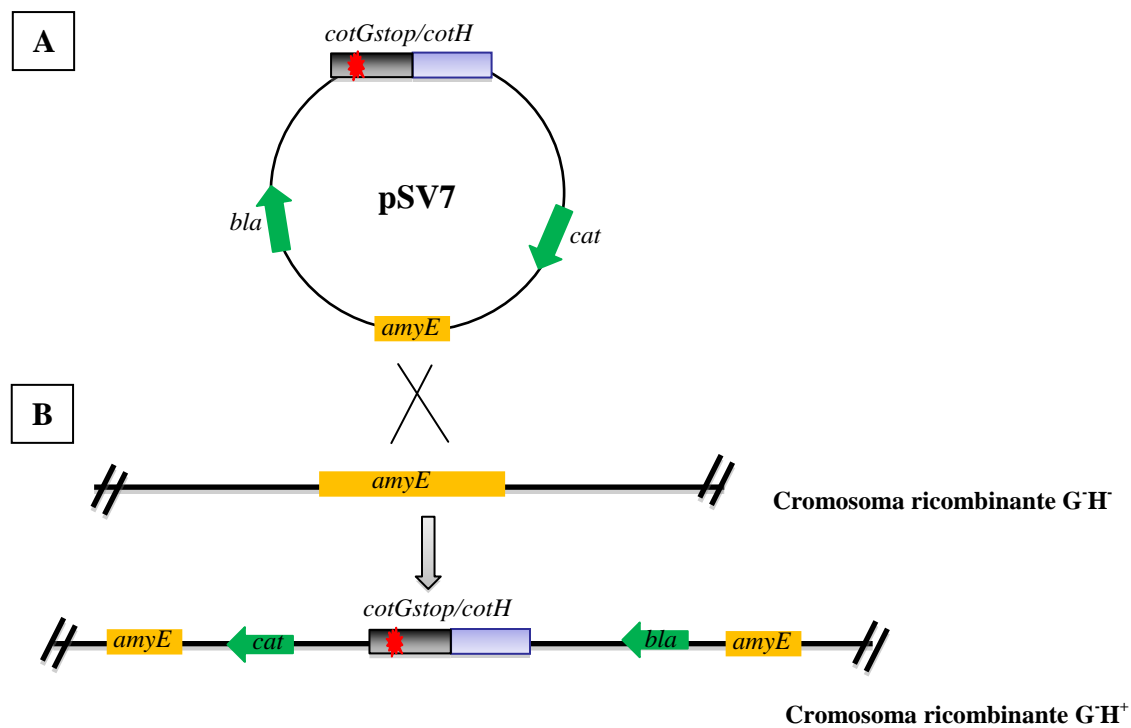


Figura 32: A) schema riassuntivo della costruzione del plasmide pSV7; B) schema d'integrazione per singolo *crossing-over* (tipo Campbell) del plasmide pSV7 nel cromosoma del ceppo AZ603 (G⁻H⁻).

I trasformanti resistenti al cloramfenicolo che si ottengono dopo trasformazione del ceppo G^-H^- con tale plasmide, saranno il risultato di un singolo evento di crossing-over (tipo *Campbell*) avvenuto a livello delle regioni *amyE* presenti sul plasmide e sul cromosoma (figura 32).

3.4.5 Costruzione dei ceppi di controllo G^+H^+ e G^-H^-

Prima di analizzare le caratteristiche fenotipiche delle spore mutanti *cotG*⁻ ho costruito un ceppo di controllo, inserendo il locus *cotG/cotH* selvatico al locus *amyE* del ceppo G^-H^-

In tal modo è ripristinato un fenotipo selvatico utilizzando un ceppo che ha lo stesso *background* genetico del mutante G^-H^- costruito in precedenza. La strategia di clonaggio si è basata sull'utilizzo del plasmide pVS7 contenente il locus *cotGstop/cotH*. Il plasmide è stato digerito con gli enzimi di restrizione *SpeI* e *BglII*, in modo da escindere l'allele *cotGstop* mutato ed utilizzare il vettore per il clonaggio di una copia di *cotG* selvatica. La

sequenza selvatica del gene *cotG* è stata prelevata dal plasmide pE23 (già disponibile in laboratorio) mediante digestione con gli stessi enzimi di restrizione. Da alcune cellule di *E.coli* ottenute dalla trasformazione è stato estratto il DNA plasmidico che è stato digerito successivamente con gli enzimi *SpeI* e *BglII* per verificare la presenza dell'inserto. Uno dei cloni positivi è stato chiamato pVS8. Tale plasmide è stato quindi utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo G⁻H⁻ ed i trasformanti ottenuti, selezionati per la resistenza al cloramfenicolo, sono il risultato di un singolo evento di *crossing-over* (tipo *Campbell*) avvenuto a livello del gene *amyE* tra le sequenze omologhe presenti nel plasmide e sul cromosoma.

I cloni ricombinanti sono stati controllati per PCR per verificare la corretta organizzazione genica. Uno dei cloni positivi è stato denominato G⁺H⁺ ed è stato utilizzato negli esperimenti successivi (figura 33).

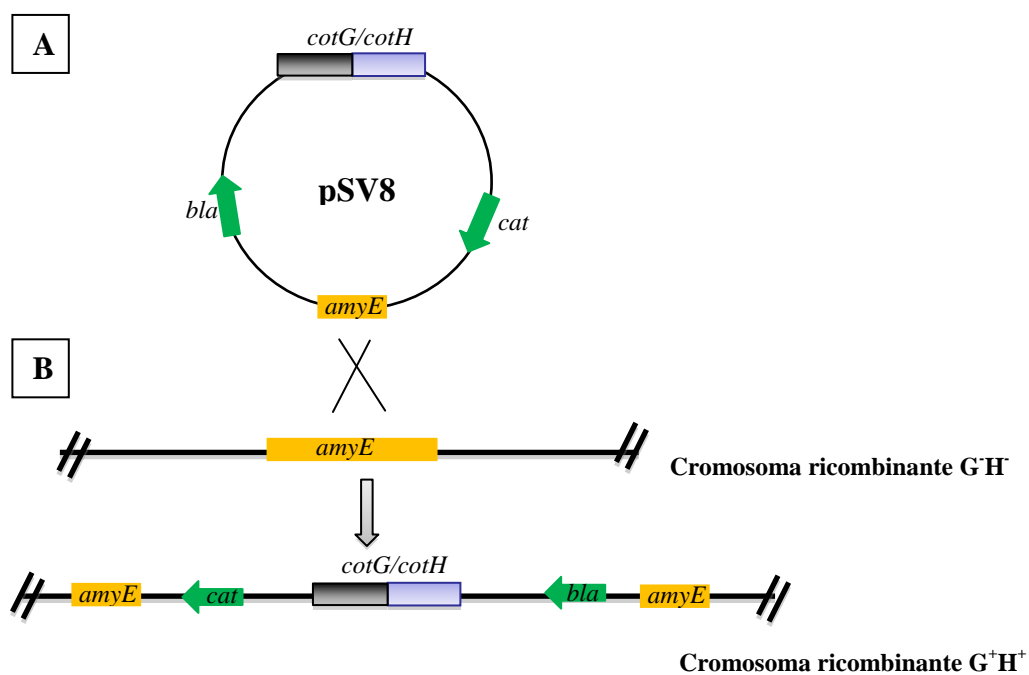


Figura 33: A) schema riassuntivo della costruzione del plasmide pSV8; B) schema d'integrazione per singolo *crossing-over* (tipo Campbell) nel cromosoma del ceppo AZ603 (G⁻H⁻).

Un ulteriore ceppo di controllo è stato costruito trasferendo il solo gene *cotG* al locus *amyE* del mutante G^-H^- . In tal modo si ottiene un ceppo con fenotipo G^+H^- con lo stesso *background* genetico dei mutanti precedenti. A tale scopo è stato costruito il plasmide integrativo *pcotG* in cui il gene *cotG*, amplificato mediante PCR utilizzando come stampo il DNA cromosomale del ceppo selvatico, AZ54, e gli oligonucleotidi H19 e G22, è stato clonato nel vettore di integrazione *pDG364* (figura 34). Il plasmide veniva linearizzato con *PstI* e utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo G^-H^- . I trasformanti resistenti al cloramfenicolo ottenuti, sono il risultato di un doppio evento di *crossing-over* tra le regioni *amyE* presenti sul plasmide e sul cromosoma, evento che determina l'integrazione del gene *cotG* al locus *amyE*. I cloni ricombinanti sono stati controllati per PCR per verificare la corretta organizzazione genica e uno dei cloni positivi, chiamato G^+H^- , è stato utilizzato negli esperimenti successivi (figura 34).

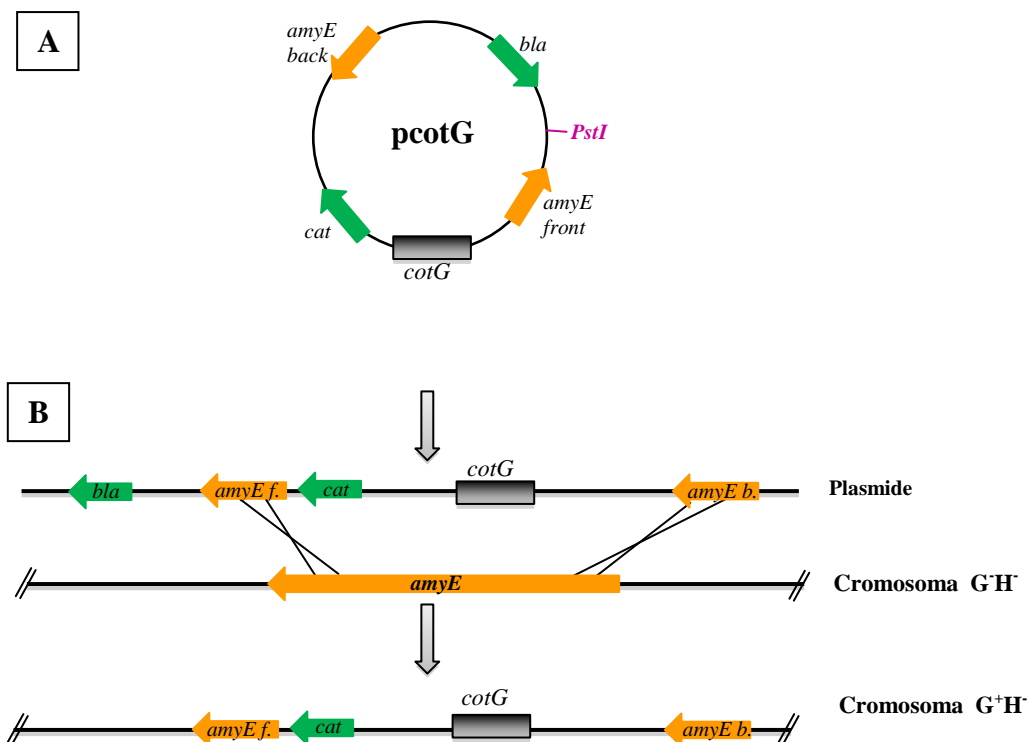


Figura 34: **A)** schema riassuntivo della costruzione del plasmide pCotG; **B)** schema d'integrazione per doppio *crossing-over* al locus *amyE* nel cromosoma del ceppo AZ603 (G⁻H⁻).

3.4.6 Analisi strutturale delle spore mutanti *cotG*- mediante SDS-PAGE e *western blot*

Per studiare l'effetto della mutazione nel gene *cotG* sull'assemblaggio della tunica sporale ho deciso di analizzare le proteine estratte dalla tunica delle spore mediante SDS-PAGE e western-blot utilizzando anticorpi specifici contro diverse proteine della tunica. In particolare ho selezionato le proteine CotH, CotC e CotB, che da diversi anni sono oggetto di studio nel laboratorio dove ho svolto la mia attività e, per le quali avevo a disposizione anticorpi specifici. D'altra parte è noto che tali proteine interagiscono tra loro e con CotG in maniera più o meno diretta. Sappiamo, infatti, che CotH è responsabile dell'assemblaggio di CotC e CotG che, a sua volta, influenza l'assemblaggio di CotB (Naclerio *et al.*, 1996; Zilhao *et al.*, 2004). Per un'analisi più completa, gli esperimenti sono stati effettuati non solo sui ceppi da me costruiti in questo studio, ma anche su mutanti già disponibili ed utilizzati in precedenza in diversi lavori sperimentali pubblicati prima che l'organizzazione genica del locus *cotG/cotH* fosse nota. In particolare ho

considerato nelle mie analisi il mutante *cotH*⁻ ottenuto per inserzione di una cassetta per la resistenza al cloramfenicolo inserita nel gene *cotH* (ceppo ER220, Naclerio *et al.*, 1996) ed il mutante ER203 ottenuto per sostituzione del gene *cotG* con una cassetta per la resistenza all'eritromicina (Naclerio *et al.*, 1996). Sulla base dei dati messi in luce in questo studio, tale mutante, finora considerato come un *cotG*⁻, è in realtà un doppio mutante *G⁻H⁻*.

Pertanto i ceppi considerati nelle prossime analisi sono i seguenti:

1. **wt** (AZ54), non contenente alcun costrutto genico;
2. ***G⁻H⁻*** (ER203), contenente una cassetta *Erm^R* in sostituzione di *cotG* (ceppo già disponibile in laboratorio, Naclerio *et al.*, 1996)
3. ***G⁺H⁻*** (ER220), contenente un'inserzione nel gene *cotH* (ceppo già disponibile in laboratorio; Naclerio, *et al.*, 1996).
4. ***G⁻H⁻* (Δ)**, contenente la delezione dell'intero locus *cotG/cotH*

5. G^+H^+ (Δ/GH), contenente il locus *cotG/cotH* inserito nel gene *amyE* del ceppo Δ ed usato come controllo della funzionalità dei costrutti;

6. G^-H^+ ($\Delta/G_{stop}H$), contenente il costrutto *cotG_{stop}/cotH* al locus *amyE* del ceppo Δ

7. G^+H^- (Δ/G), contenente il gene *cotG* al locus *amyE* del ceppo Δ .

Per rendere più chiara la trattazione ho riportato nella tabella successiva le principali caratteristiche genotipiche e fenotipiche dei ceppi da me analizzati:

N°	Nome	Locus <i>cotG/cotH</i>	Locus <i>amyE</i>	fenotipo	Ref.
1	wt	-	-	G^+H^+	Naclerio <i>et al</i> 1996
2	ER203	<i>cotG::erm</i>	-	G^-H^-	Naclerio <i>et al</i> 1996
3	ER220	<i>cotH::cat</i>	-	G^+H^-	Naclerio <i>et al</i> 1996
4	Δ	$\Delta cotGcotH::Neo$	-	G^-H^-	Questo lavoro
5	Δ/GH	$\Delta cotGcotH::Neo$	<i>cotGcotH</i>	G^+H^+	Questo lavoro
6	$\Delta/G_{stop}H$	$\Delta cotGcotH::Neo$	<i>cotGstop-cotH</i>	G^-H^+	Questo lavoro
7	Δ/G	$\Delta cotGcotH::Neo$	<i>cotG</i>	G^+H^-	Questo lavoro

3.4.7 Analisi delle proteine della tunica per SDS-PAGE

Le spore dei ceppi ricombinanti sono state purificate, come descritto in Materiali e Metodi, e quantificate mediante lettura OD a 580nm. Per confrontare il *pattern* delle proteine estratte dalla tunica dei vari mutanti, ho effettuato l'estrazione a partire dalla stessa quantità di spore. Quindi le spore sono state risospese nel tampone sample buffer 2X, incubate per 5' a 100°C e la stessa quantità di proteine circa 20 µg è stata caricata su gel al 12% (figura 35). Quest'analisi mi ha permesso innanzitutto di verificare che il sistema di costruzione dei ceppi da me utilizzato funzionava nella maniera corretta. Infatti, il ceppo di controllo G^+H^+ (pozzetto 5 di figura 35), in cui ho inserito il costrutto *cotG/cotH* selvatico al locus *amyE*, presenta un *pattern* proteico uguale al ceppo *wt* (pozzetto 1) e in particolare presenta la banda corrispondente alla proteina CotG. In tutti gli altri ceppi, come atteso, la banda non è presente.

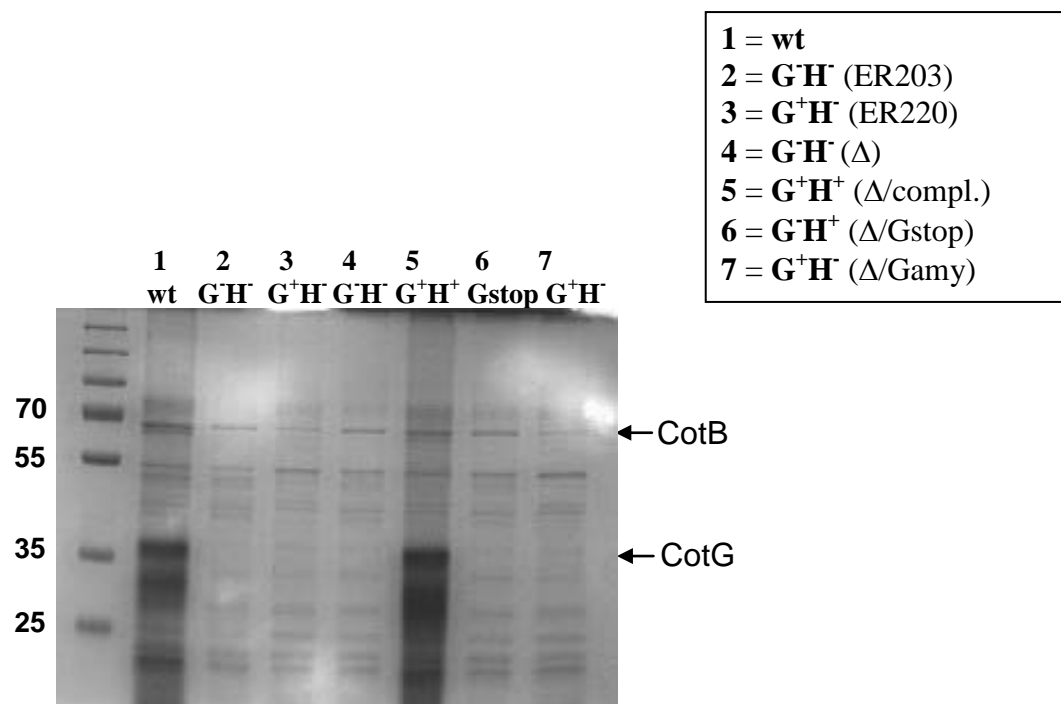


Figura 35: SDS-PAGE di proteine estratte dalla tunica sporale mediante trattamento con SDS. Nel riquadro sono evidenziati i ceppi utilizzati.

Infatti, nel caso dei mutanti in *cotG* (pozzetti 2, 4 e 6) la proteina non viene sintetizzata, mentre, nel caso del mutante in *cotH* (pozzetti 3 e 7), la proteina, pur essendo normalmente sintetizzata, non viene assemblata sulla tunica (Zilhao, *et al.*, 2004). Il corretto assemblaggio di CotG nei ceppi G^+H^+ è testimoniato anche dalla presenza della forma matura di CotB di 66 KDa che, come è noto, è direttamente dipendente da CotG (pozzetti 1 e 5, Zilhao, *et al.*, 2004).

Per valutare specificamente la presenza di proteine come CotH e CotC e per valutazioni quantitative, è comunque necessario analizzare le proteine mediante *western blot* con anticorpi specifici.

3.4.8 Western blot anti-CotH

Per valutare l'assemblaggio della proteina CotH nei mutanti da me costruiti ho effettuato un esperimento di *western blot* sulle proteine estratte dalla tunica delle spore di tali ceppi, descritti in precedenza. I batteri sono stati cresciuti in DSM in modo tale da indurre la sporulazione

(Materiali e Metodi paragrafo 2.15).

Le spore mature sono state purificate e le proteine estratte mediante trattamento con SDS a partire dalla stessa quantità di spore per ogni ceppo. Dopo la migrazione, le proteine sono state elettrotrasferite su una membrana di nitrocellulosa, mentre il gel è stato sottoposto a colorazione con Blu di Comassie in modo da verificare che la relativa quantità di proteine caricate dei vari campioni fosse paragonabile (Materiali e Metodi 2.20). La membrana è stata, quindi, incubata in presenza dell'anticorpo primario anti-CotH diluito 1:500, e successivamente incubata con l'anticorpo secondario (*anti-rabbit* coniugato con perossidasi, *Sigma*).

Le proteine riconosciute dall'anticorpo sono state visualizzate con il metodo ECL (*Amersham*), seguendo le istruzioni della ditta fornitrice. Il risultato ottenuto è mostrato nella figura 36. Anche in questo caso si può osservare che il ceppo di controllo da me costruito G^+H^+ esprime normalmente la proteina CotH (pozzetto 5), mentre, come atteso, i mutanti *cotH* non presentano

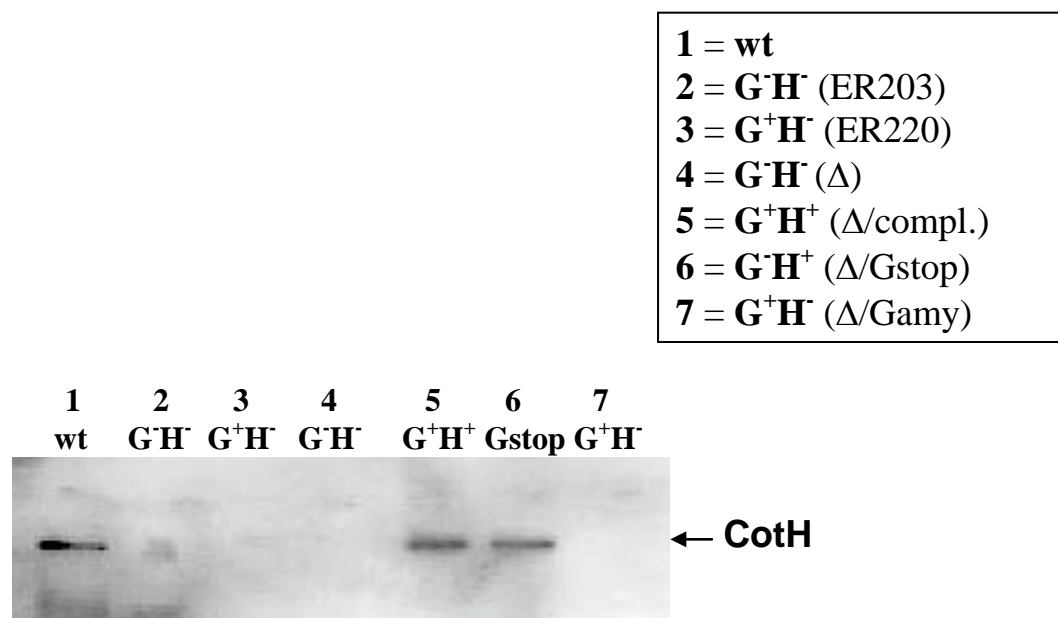


Figura 36: western anti-CotH di proteine estratte dalla tunica sporale mediante trattamento con SDS. Nel riquadro sono evidenziati i ceppi utilizzati.

alcuna banda riconosciuta dall'anticorpo (pozzetti 2, 3, 4 e 7). Il singolo mutante *cotG⁻* (pozzetto 6) che contiene la mutazione puntiforme nel gene *cotG*, esprime ed assembla normalmente la proteina CotH, confermando ancora una volta che il sistema sperimentale da me utilizzato funziona in maniera corretta.

3.4.9 Western blot anti-CotB

In letteratura è riportato che il gene *cotB* codifica per una proteina di 46 kDa, ma si accumula nelle spore mature, nello strato esterno del *coat*, come un polipeptide di 66 kDa. Tale conversione richiede un fattore *subtilis*-specifico giacché non avviene esprimendo il gene *cotB* in un ospite eterologo quale, ad esempio, *Escherichia coli* (Zilhao *et al.*; 2004). Gli studi condotti finora hanno mostrato che la proteina CotG è direttamente responsabile della conversione e che in un mutante *cotG⁻*, che non esprime CotG o in un mutante *cotH⁻* che non ne consente l'assemblaggio, la conversione di CotB nella forma matura non avviene. In realtà questi studi sono stati

condotti utilizzando un mutante *cotG*⁻ ottenuto per sostituzione del gene con una cassetta di resistenza ad un antibiotico e che, sulla base degli studi condotti in questo laboratorio, risulta, in realtà, un doppio mutante *cotG*⁻/*cotH*⁻. Come prima cosa quindi mi sono chiesta se e in quale forma avveniva l'assemblaggio di CotB nel singolo mutante *cotG*⁻ da me costruito. A tale scopo le proteine estratte dalla tunica dei ceppi selvatici e mutanti sono state estratte mediante trattamento con SDS ed analizzate per western blot utilizzando anticorpi specifici anti-CotB, seguendo lo stesso protocollo descritto nel paragrafo precedente (Materiali e Metodi 2.20). Il risultato ottenuto, mostrato in figura 37, conferma i dati di letteratura in quanto si osserva che la forma matura di CotB è presente solo nei ceppi wt e G⁺H⁺ che hanno una copia selvatica dei geni *cotG* e *cotH* (pozzetti 1 e 4). In tutti i mutanti e in particolare nel ceppo *cotG*⁻ da me costruito e analizzato per la prima volta, è presente solo la forma di CotB di 46 kDa (pozzetto 3) confermando che la proteina CotG è direttamente responsabile della maturazione di CotB.

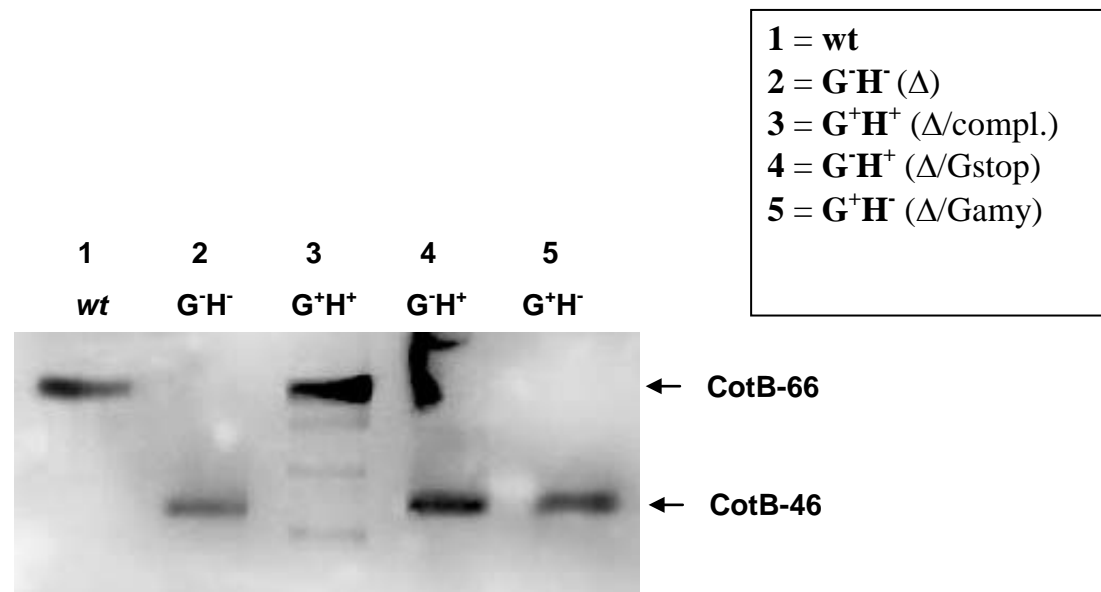


Figura 37: analisi delle proteine estratte dalle spore dei ceppi indicati mediante western blot con anticorpi anti-CotB Nel riquadro sono evidenziati i ceppi utilizzati.

3.5 Analisi dell'assemblaggio di CotC

La proteina CotC è un polipeptide di 12 kDa che si assembla sulla tunica sporale in forme multiple (Isticato *et al.* 2004). In particolare, le forme di 12 e 21 kDa corrispondono al monomero e all'omodimero di CotC che vengono assemblati sulla spora in formazione immediatamente dopo la loro sintesi. Le altre due forme, di 12,5 e 30 kDa, derivano dalle due forme primarie a seguito di modifiche post-traduzionali, che avvengono direttamente sulla superficie sporale durante la fase di maturazione della spora (Isticato *et al.*, 2004). Inoltre è noto che CotC forma un eterodimero di 23 kDa con la proteina omologa CotU (17 kDa) (Isticato *et al.*, 2008). Dato l'elevato grado di omologia, le due proteine sono riconosciute egualmente bene dall'anticorpo anti-CotC e pertanto l'analisi per *western-blot* di proteine estratte dalla tunica di spore selvatiche evidenzia 6 bande proteiche in parte CotC- ed in parte CotU-dipendenti.

Dati di letteratura indicano che la proteina CotC è piuttosto instabile e che per il suo corretto assemblaggio

richiede la presenza di CotH. In un mutante *cotH*, infatti, la proteina, pur essendo normalmente sintetizzata (Naclerio *et al.*; 1996) non è assemblata sulla spora e non è nemmeno accumulata tra le proteine della cellula madre. Questo dato ha fatto pensare che CotH potrebbe avere una funzione tipo *chaperone* nello stabilizzare e proteggere CotC dalla degradazione. Questa ipotesi è rafforzata dal fatto che in un mutante che esprime una maggiore quantità di CotH è possibile evidenziare la presenza di CotC sia nella cellula madre che nella spora (Isticato *et al.*; 2008).

Per completare la caratterizzazione strutturale dei mutanti da me costruiti ho deciso di analizzare il pattern di assemblaggio di CotC (e CotU) nella tunica sporale. I ceppi sono stati cresciuti in DSM, per indurre la sporulazione e dopo circa 36 ore di crescita a 37°C, le spore sono state purificate come descritto nei Materiali e Metodi paragrafo 2.15.1. Questa volta le proteine sono state estratte mediante un trattamento delle spore con

NaOH 0,1 M (Materiali e Metodi 2.16.2) in quanto è noto che la proteina CotC viene estratta maggiormente con soluzioni alcaline. Le proteine estratte sono state quindi analizzate per western blot con anticorpi anti-CotC.

3.5.1 Western-blot con anticorpi anti-CotC

Le proteine estratte dalla tunica dei vari mutanti sono state analizzate per western blot con l'anticorpo primario anti-CotC diluito 1:5000. Successivamente la membrana è stata incubata con con l'anticorpo secondario (*anti-rabbit* coniugato con perossidasi, *Sigma*) e quindi sviluppata con il metodo ECL (*Amersham*). Il risultato ottenuto è mostrato in figura 38: sia nel ceppo *wt* che nel ceppo ricombinante G^+H^+ da me costruito si osserva la presenza delle 6 bande specifiche corrispondenti alle forme multiple di CotC e CotU (pozzetti 1 e 4) e conferma che il sistema sperimentale funziona in maniera corretta; nel singolo mutante *cotH* (pozzetto 5) la proteina è completamente assente, confermando la dipendenza di CotC dalla presenza di CotH; anche nel singolo mutante

cotG⁻ (pozzetto 3), la proteina CotC si assembla in maniera corretta suggerendo che la sola presenza di CotH è sufficiente per garantire l'assemblaggio di CotC sulla tunica. Totalmente inatteso è il risultato ottenuto dall'analisi del doppio mutante *G⁻H⁻* (pozzetto 2). In questo ceppo, infatti, la proteina CotC si assembla in tutte le sue forme esattamente come in un ceppo selvatico, nonostante l'assenza della proteina CotH. A differenza del singolo mutante *cotH* questo ceppo manca anche della proteina CotG ed è probabilmente proprio l'assenza di CotG a consentire l'assemblaggio di CotC sulla tunica. Secondo questa ipotesi la proteina CotG ha un effetto negativo su CotC (degradazione?) e tale effetto è controbilanciato dalla presenza di CotH che, invece, la protegge.

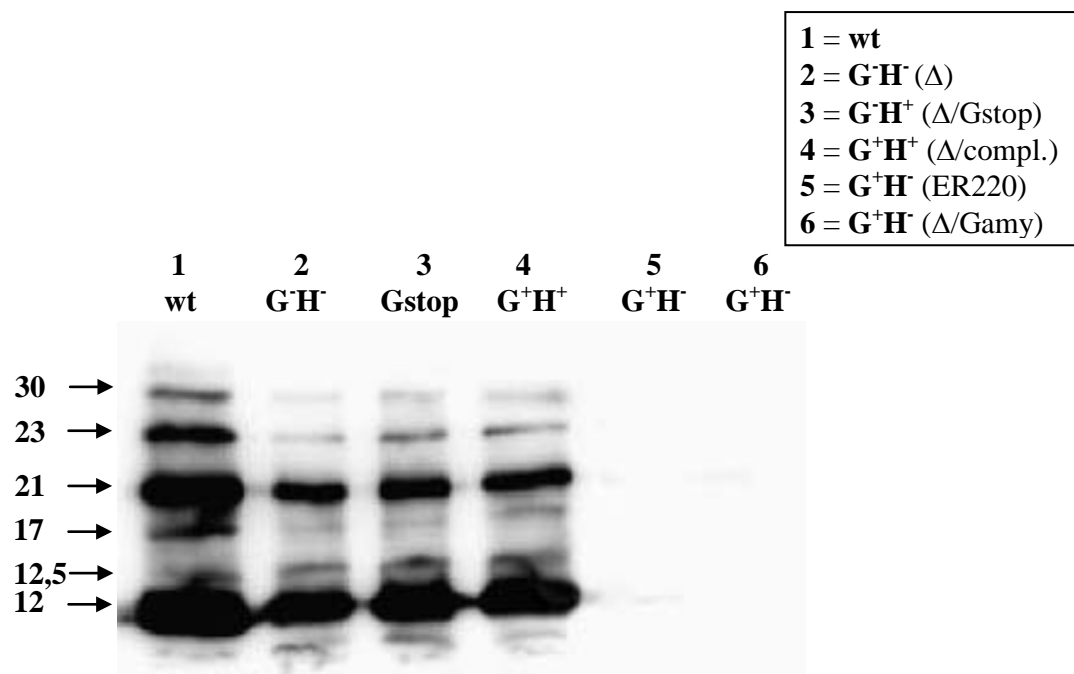


Figura 38: western anti-CotC di proteine estratte dalla tunica sporale mediante trattamento con NaOH 0.1M. Nel riquadro sono evidenziati i ceppi utilizzati.

In linea con questa ipotesi è il risultato che si ottiene quando una copia selvatica di *cotG* viene reintrodotta nel doppio mutante *G⁻H⁻* (pozzetto 6): la presenza della sola proteina CotG, determina la scomparsa di CotC e CotU dalla spora, indicando, ancora una volta, che in assenza di CotH, CotG ha un effetto negativo su CotC e CotU.

Pertanto, l'assenza di CotC e CotU nel ceppo *cotH⁻* non è dovuta direttamente alla mancanza di CotH come si è pensato fino ad ora, ma, piuttosto, alla presenza di CotG che, in assenza di CotH, esercita un ruolo negativo su CotC e CotU.

Resta da chiarire con quale meccanismo CotG esercita tale effetto negativo e se l'azione è esercitata sulla tunica o nella cellula madre. Ricordiamo che nei mutanti *cotH⁻* la proteina CotG non è mai visibile tra le proteine estratte dalla tunica sporale (figura 35) e pertanto sembra più probabile che agisca nel citoplasma della cellula madre. Contrariamente a quanto atteso, l'analisi per *western-blot* delle proteine estratte dal citoplasma della cellula madre del mutante *cotH⁻* tra T6 e T9 (quando il gene *cotG* è

massimalmente espresso), non ha rivelato la presenza di alcuna banda proteica riconosciuta dall'anticorpo anti-G. L'assenza di segnale non può essere dovuta all'assenza della proteina CotG (la cui presenza è testimoniata dall'effetto esercitato su CotC) ma piuttosto ad un problema di riconoscimento da parte dell'anticorpo. D'altra parte è stato recentemente dimostrato con esperimenti di microscopia fluorescenza, che la proteina di fusione CotG-Gfp è effettivamente presente nel citoplasma della cellula madre di un mutante *cotH* (Kim and Driks 2008).

Sarebbe inoltre interessante capire in che modo CotH riveste il suo ruolo protettivo. La proteina, infatti, potrebbe interagire direttamente con CotC proteggendola, oppure con CotG bloccandone l'azione. Esperimenti d'immunoprecipitazione potrebbero essere utili per chiarire questo aspetto.

3.6 Analisi fisiologica dei mutanti

La corretta formazione della tunica sporale è responsabile della caratteristica resistenza delle spore a vari agenti chimici (lisozima, cloroformio, etanolo) ed è soprattutto responsabile della capacità delle spore di germinare efficientemente al ripristinarsi di condizioni ambientali favorevoli al ciclo di crescita vegetativo.

Per chiarire anche da un punto di vista fisiologico la funzione delle proteine CotG e CotH, ho analizzato le spore dei diversi mutanti da me costruiti per la resistenza al lisozima e la capacità di germinare.

3.6.1 Saggio di resistenza al lisozima

Per valutare la resistenza delle spore in diverse condizioni, viene generalmente monitorata l'integrità della tunica sporale attraverso letture spettrofotometriche.

La presenza di una tunica sporale integra, infatti, è responsabile della caratteristica rifrangenza delle spore. Quando la tunica è sensibilmente alterata da un trattamento fisico o chimico oppure quando è degradata

nella fase di germinazione, si osserva la perdita della rifrangenza, misurabile attraverso la diminuzione della densità ottica allo spettrofotometro. Per valutare la resistenza al lisozima, un'aliquota di spore che presentano una densità ottica a 580 nm di circa 0,3 OD, viene incubata in presenza di lisozima (250µg/ml) e ogni minuto viene misurata la densità ottica. I valori ottenuti sono stati riportati nel grafico mostrato in figura 39. Come si evince dal grafico, tutti i mutanti presentano la stessa resistenza al lisozima delle spore *wt*. Come controllo, lo stesso esperimento è stato effettuato con un ceppo *cotE*⁻ che è notoriamente sensibile al lisozima.

3.6.2 Saggio di germinazione

Il saggio di germinazione consiste nell'incubare le spore in presenza di sostanze che fungono da germinanti. La funzione di tali sostanze è quella di causare la degradazione della tunica sporale ed indurre la cosiddetta fase di esocrescita che comporta la formazione di una cellula vegetativa.

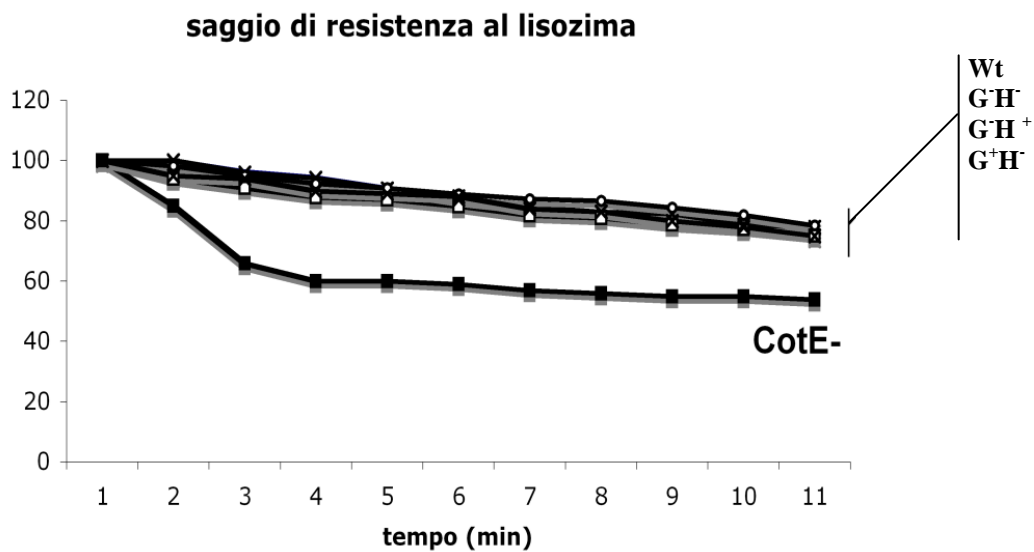


Figura 39: saggio di resistenza al lisozima. Le spore dei ceppi indicati sono state incubate in presenza di lisozima ed ogni minuto è stata valutata la variazione della densità ottica a 580 nm. Come controllo dell'esperimento sono state utilizzate le spore di un ceppo *cotE⁻* notoriamente sensibili al lisozima.

Anche in questo caso, l'efficienza di germinazione è valutata come % di diminuzione della densità ottica a 580 nm in presenza di acido aspartico, utilizzato come induttore della germinazione. Le spore wt e mutanti sono state incubate a 37°C in presenza del germinante e la variazione della densità ottica è stata seguita mediante misure spettrofotometriche effettuate per 1 ora ad intervalli di 5 minuti. I risultati ottenuti sono riportati nel grafico della figura 40.

Il dato interessante che si evince dal grafico è che il mutante G^+H^- presenta un difetto nell'efficienza di germinazione che non è dovuto all'assenza di *cotH* ma piuttosto alla presenza di CotG. Il doppio mutante G^-H^- , infatti, pur mancando della proteina CotH ha una efficienza di germinazione uguale a quella di un ceppo wt. Anche in questo caso il risultato ottenuto suggerisce che la proteina CotG ha un effetto negativo sulla germinazione e che tale effetto è controbilanciato dalla presenza di CotH.

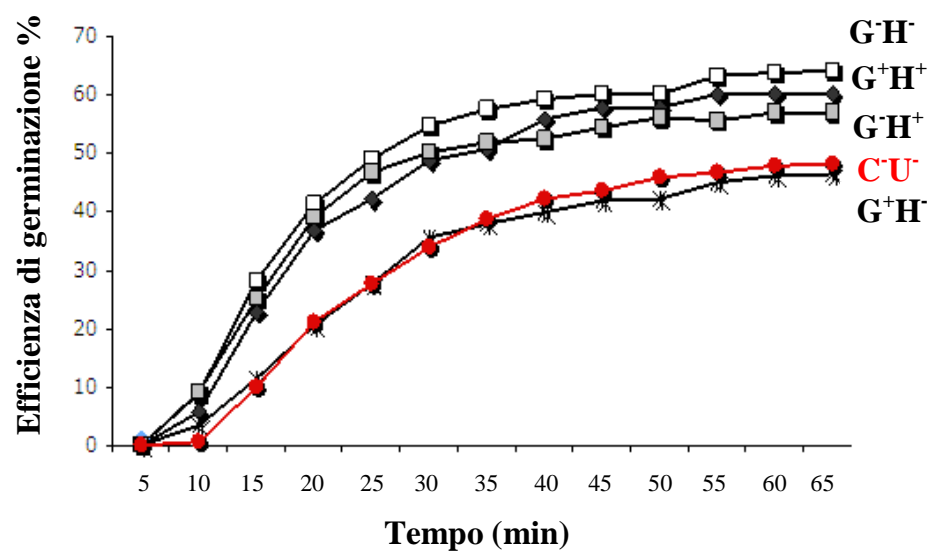


Figura 40: saggio di efficienza di germinazione.

Poiché abbiamo visto che lo stesso mutante G^+H^- non contiene le proteine CotC e CotU sulla spora, ci siamo chiesti se fosse la mancanza di tali proteine a determinare il difetto di germinazione. Abbiamo quindi ripetuto il saggio sulle spore di un mutante $cotC^-/cotU^-$ e, a conferma della nostra ipotesi, abbiamo nuovamente osservato lo stesso difetto di germinazione. I dati finora ottenuti pertanto suggeriscono che CotG ha un ruolo negativo su CotC e CotU che, a loro volta, potrebbero essere direttamente o indirettamente coinvolte nella capacità delle spore di germinare in risposta all'acido aspartico.

4.Riassunto e Conclusioni

La spora di *B. subtilis* è una struttura metabolicamente quiescente, altamente resistente a condizioni chimiche e fisiche normalmente letali per le cellule vegetative ed in grado di germinare quando si ripristinano condizioni ambientali favorevoli. Tali caratteristiche sono in parte dovute alla presenza della tunica sporale, una struttura proteica che avvolge la spora e che è sintetizzata nelle fasi finali del processo di sporulazione. La sintesi e l'assemblaggio dei componenti della tunica (proteine Cot) sono finemente controllati sia a livello trascrizionale, mediante la sintesi temporalmente differenziata dei geni *cot*, sia post-traduzionale, mediante l'intervento di quattro proteine regolative ad azione morfogenetica che controllano l'assemblaggio delle proteine Cot. La corretta formazione della tunica è importante per garantire la resistenza della spora a diverse condizioni non fisiologiche e la capacità di germinare efficientemente. Tra le proteine della tunica che hanno sia una funzione strutturale sia regolativa sull'assemblaggio di altri componenti, vi sono CotH e CotG, oggetto di studio durante la mia attività di dottorato. E' stato osservato che in mancanza della proteina CotH la tunica sporale risulta profondamente alterata in entrambi gli strati ed almeno 9 proteine strutturali sono risultate CotH-dipendenti (Kim *et al.* 2010). In particolare è stato evidenziato che CotH è responsabile dell'assemblaggio di CotC e CotG che, a sua volta, controlla la maturazione e l'assemblaggio di CotB, secondo il modello

proposto a pagina 33. I geni *cotG* e *cotH* sono adiacenti sul cromosoma di *B. subtilis* e sono trascritti in maniera divergente (figura 8) grazie al fattore σ^K dell'RNA polimerasi. La loro espressione avviene in maniera differenziata nel tempo grazie all'intervento del regolatore trascrizionale GerE, che agisce da repressore di *cotH* e da attivatore di *cotG* (Baccigalupi *et al.*, 2004).

Il mio lavoro di tesi ha evidenziato che l'organizzazione del locus genico è molto più complessa di quanto noto finora. Mediante la costruzione di fusioni traduzionali *cotH::lacZ* ho, infatti, mostrato che per l'espressione del gene *cotH* sono necessarie più di 800 basi a monte della sequenza codificante (figura 10). Esperimenti di RT-PCR e di *primer extension* indicano che tale regione viene trascritta e che il sito di inizio della trascrizione mappa ad una distanza di 812 basi dall'ATG (figure 12 e 13). L'ipotesi che questa regione codifichi per un prodotto proteico appare improbabile, in quanto, pur essendo presenti diversi codici di lettura aperti (ORFs) sui tre *frames*, nessuno di essi contiene i segnali canonici di traduzione quali la sequenza di Shine-Dalgarno e una probabile tripletta d'inizio (ATG, TTG). La lunga regione a monte di *cotH* è stata pertanto chiamata 5'UTR e gli studi successivi sono stati rivolti allo studio della sua funzione. A tale scopo diversi esperimenti sono stati allestiti per analizzare sia l'espressione genica che la sintesi e l'assemblaggio della proteina CotH in presenza ed in assenza della

5'UTR. I risultati di tali esperimenti, mostrati nelle figure 16 e 20, indicano che non ci sono sostanziali differenze e che pertanto la presenza della regione 5'UTR non influenza ne' la sintesi e ne' la traduzione dell'RNA messaggero (figure 16 e 20).

Bisogna a questo punto ricordare che tra il promotore del gene *cotH* e la sequenza codificante, è interamente contenuto il gene divergente *cotG* che risulta, pertanto, non più adiacente, ma sovrapposto al gene *cotH* (figura 22 A). Questo dato non è mai stato evidenziato prima d'ora perché solo adesso è stata chiarita l'effettiva localizzazione del promotore del gene *cotH*. La dimensione insolita della regione 5'-UTR, insieme alla mancanza di una funzione regolativa e alla presenza del gene divergente *cotG* tra il promotore e la regione codificante, mi hanno spinto ad indagare maggiormente sul locus genico ed a chiedermi, innanzitutto, se questa peculiare organizzazione cromosomica fosse conservata tra i Bacilli sporigeni. Dal confronto delle sequenze aminoacidiche di CotG e CotH di *B. subtilis* con tutte le ORF tradotte dei procarioti i cui genomi sono stati completamente sequenziati, si osserva che mentre CotH è molto conservata in tutti i Batteri sporigeni, la proteina CotG risulta presente solo in 6 specie, di cui 4 Bacilli e 2 Geobacilli (tabella 4). Da questa analisi possiamo concludere che da un punto di vista filogenetico, il gene *cotG* non è distribuito ampiamente

tra Bacilli sporigeni e, di conseguenza, anche l'organizzazione del locus genico *cotG/cotH* risulta ristretta a poche specie.

Le sei sequenze di CotG hanno lunghezze differenti, che vanno da 77 (*Geobacillus* sp. WCH70) a 198 residui di aminoacidi (*B. subtilis* subsp. *spizizeni* str. W23) e la variabilità riscontrata è principalmente dovuta alle differenze nella porzione centrale della proteina (figura 23). Questa regione, in *B. subtilis*, consta di 7 ripetizioni in *tandem* ognuna costituita da due moduli di 7 e 6 aminoacidi, rispettivamente. Le 7 ripetizioni sono poi seguite da 5 ripetizioni di 7 aminoacidi (figura 24). Tale struttura modulare si riscontra anche a livello della sequenza nucleotidica e suggerisce che il gene attuale sia il risultato di una serie di eventi di allungamento genico a partire da un gene ancestrale acquisito orizzontalmente durante l'evoluzione. In linea generale, la duplicazione genica è un meccanismo che consente di incrementare le dimensioni e la complessità di una sequenza nucleotidica e quella della proteina che ne deriva e rappresenta uno dei meccanismi alla base dell'evoluzione dei genomi microbici. In alcuni casi può coinvolgere un intero gene dando origine a due copie che, in seguito ad eventi mutazionali che convertono il codone di stop del primo gene in un codone di senso, vengono fuse in un'unica sequenza codificante (Fani *et al.*, 2004). Quando il fenomeno coinvolge solo una porzione interna del gene, come nel caso di *cotG*, gli eventi mutazionali possono

determinare che le due copie mantengano lo stesso codice di lettura dando origine ad una proteina a struttura modulare. Esempi in tal senso sono stati descritti per alcuni geni di batteri patogeni (Moxon *et al.*, 1999). Il significato biologico di questi eventi potrebbe essere il miglioramento della funzione di una proteina mediante l'aumento del numero dei siti attivi (Gao and Lynch, 2009). Nel caso di *cotG*, i possibili eventi evolutivi che hanno dato origine alla situazione attuale riscontrata in *B. subtilis*, sono descritti nel paragrafo 3.3.1 e schematizzati in figura 25.

E' interessante osservare che in tutti i ceppi in cui CotG è presente, la proteina contiene sempre dei moduli ripetuti nella porzione centrale, anche se la loro sequenza e il loro numero è variabile (figura 26). Di conseguenza, un'ipotesi evolutiva simile a quella proposta per *B. subtilis*, può essere estesa anche per le altre 5 specie che contengono il gene ortologo.

Poiché l'omologia tra le 6 proteine è limitata alle regioni N e C terminali possiamo ipotizzare che il gene originario sia costituito dalle regioni 5' e 3' e da una porzione interna di bassa complessità (ovvero contenente una bassa variabilità di nucleotidi) che rappresenta il modulo ancestrale. Il modulo, successivamente, ha subito eventi di duplicazione indipendenti che hanno dato origine alla situazione attualmente riscontrata nei vari Bacilli e Geobacilli. Non sappiamo

quale sia l'origine del "mini-gene" ancestrale. Una delle possibilità è che sia stato acquisito dai *Bacilli* e dai *Geobacilli* per trasferimento genico orizzontale a partire da un antenato comune a tutti i batteri che contengono CotG. Quest' ultima ipotesi è supportata dall'organizzazione cromosomica del locus *cotG/cotH*, che è risultata simile in tutte le specie (figura 21). Anche da un punto di vista trascrizionale, ho riscontrato che, come in *B. subtilis*, anche nelle altre 3 specie di *Bacilli* il gene *cotG* è localizzato tra il promotore e la parte codificante del gene *cotH* (figura 22). Non è chiaro se questa organizzazione genica abbia conferito un vantaggio selettivo alla cellula, ma certamente possiamo dire che l'evento è stato fissato nell'evoluzione. L'ingresso di *cotG* ed i successivi eventi di allungamento genico a carico del modulo ancestrale, potrebbero aver causato, come conseguenza, l'allontanamento del promotore di *cotH*. La cellula ha quindi regolato l'espressione dei due geni, in modo da evitare la collisione delle RNA polimerasi e permettere la trascrizione di entrambi e garantirne l'espressione. Sappiamo, infatti, che CotH ha un ruolo determinante nella formazione della tunica e l'importanza del suo ruolo è confermata dalla presenza di tale proteina in tutti i *Bacilli* sporigeni. Meno chiaro è il ruolo svolto dalla proteina CotG. Dati disponibili in letteratura indicano che sia coinvolta nella maturazione e nell'assemblaggio di CotB. Bisogna però considerare che gli studi di funzione sono stati

finora effettuati utilizzando mutanti *cotG⁻* costruiti per inattivazione genica, prima che l'organizzazione del *locus* fosse nota. Questi mutanti, quindi, sono in realtà anche *cotH⁻*. Allo scopo di chiarire la funzione di CotG mi sono proposta di costruire un mutante *null* senza alterare l'espressione del gene *cotH*. La strategia è consistita nell'inserire una singola base nel gene *cotG* in modo da sostituire una tripletta codificante per un aspartato con un codone di stop precoce (figura 29). Successivamente l'intero locus mutato veniva trasferito in un ceppo ricombinante che mancava del locus selvatico (come descritto nei paragrafi 3.4.1 e 3.4.2). L'effetto della mutazione nel gene *cotG* è stato valutato mediante l'analisi delle proteine estratte dalla tunica delle spore mutanti per *western-blot* utilizzando anticorpi specifici contro diverse proteine della tunica. In particolare ho selezionato le proteine CotC e CotB, che da diversi anni sono oggetto di studio nel laboratorio dove ho svolto la mia attività di dottorato e per le quali avevo a disposizione anticorpi specifici. I risultati ottenuti indicano che, per quanto riguarda l'assemblaggio di CotB, non ci sono sostanziali differenze tra il mutante *cotG⁻* da me costruito ed il doppio mutante *G⁻H⁻* finora utilizzato come singolo mutante. In entrambi i casi la proteina CotB non viene convertita nella forma matura di 66 kDa (figura 37), confermando che CotG è direttamente responsabile della maturazione di CotB (Zilhao et al. 2004). Il dato del tutto inatteso è emerso dall'analisi

dell'assemblaggio di CotC sulla tunica. La proteina CotC è un polipeptide di 12 kDa che si assembla sulla tunica sporale in forme multiple che corrispondono alla forma monomerica e dimerica della proteina e loro modificazioni post-traduzionali che si verificano per la maggior parte a livello della tunica sporale (Isticato *et al.* 2004). Pertanto, quando le proteine della tunica vengono analizzate con l'anticorpo anti-CotC, sono visibili 6 bande proteiche distinte (figura 38).

La mia analisi rivela che nel singolo mutante G^+H^+ la proteina è normalmente assemblata sulla tunica confermando che l'assemblaggio di CotC dipende dalla presenza del gene *cotH* (Isticato, R., *et al.*; 2004). Il dato nuovo e del tutto inatteso, che è emerso dai miei esperimenti, è la presenza di CotC nel doppio mutante G^+H^- , in cui la proteina si assembla regolarmente sulla tunica, nonostante l'assenza di CotH (figura 38, pozzetto 2). A differenza del singolo mutante *cotH*, questo ceppo manca anche della proteina CotG ed è, probabilmente, proprio l'assenza di CotG a consentire l'assemblaggio di CotC sulla tunica. Secondo questa ipotesi, la proteina CotG ha un effetto negativo su CotC (degradazione?) e questo effetto è controbilanciato dalla presenza di CotH che, in qualche modo, protegge CotC dalla degradazione. Resta da chiarire con quale meccanismo CotG esercita il suo effetto negativo e se CotH esplica il suo ruolo di protezione interagendo direttamente

con CotC, impedendone, ad esempio, la degradazione, oppure interagendo con CotG, bloccandone l'attività. Le spore mutanti sono state analizzate anche da un punto di vista fisiologico ed è stato osservato che il mutante G^+H^- mostra una minore efficienza di germinazione rispetto al ceppo selvatico e agli altri mutanti (figura 40). Anche in questo caso, l'effetto è indipendente dall'assenza di CotH in quanto, il doppio mutante G^+H^- si comporta esattamente come il wt. Questi dati indicano che CotG ha un ruolo negativo anche sull'efficienza di germinazione e che tale effetto è controbilanciato dalla presenza di CotH. Il difetto di germinazione osservato nel ceppo G^+H^- è probabilmente dovuto all'assenza di CotC e CotU, poiché le spore mutanti *cotC⁻U⁻* sono ugualmente difettive nella germinazione. Sarebbe a questo punto interessante cercare di capire quale sia il ruolo fisiologico di CotG, non solo in *B. subtilis* ma anche negli altri batteri che contengono la proteina. I miei dati farebbero pensare ad un ruolo negativo che viene controbilanciato dalla presenza di CotH che, in qualche modo, protegge la cellula mascherando l'azione di CotG. D'altra parte si deve considerare che il gene *cotG*, una volta integrato nel cromosoma, è stato stabilmente mantenuto durante l'evoluzione che ne ha consentito l'espressione nonostante la sovrapposizione con il gene *cotH*. Inoltre, la presenza dei moduli ripetuti in tutte le proteine CotG, lascia pensare che l'evento di duplicazione genica sia stato favorito dalla

selezione, certamente allo scopo di garantire (o anche migliorare) una funzione della proteina che non può essere soltanto negativa e che probabilmente non è stata ancora chiarita.

I risultati da me ottenuti possono essere riepilogati nei punti seguenti:

- ✓ Il promotore del gene *cotH* che dista 812 basi dall'ATG;
- ✓ Il gene *cotH* possiede una 5'UTR non tradotta molto estesa, non comune nei procarioti, la cui funzione non è stata ancora chiarita;
- ✓ La 5'UTR contiene il gene divergente *cotG* che, da un'analisi bioinformatica, è risultato presente solo in 4 *Bacilli* e 2 *Geobacilli*;
- ✓ La struttura del locus *cotH/cotG* è conservata nelle così come il meccanismo trascrizionale;
- ✓ *cotG* ha una struttura modulare che, da un punto di vista evolutivo, suggerisce che derivi da un fenomeno di allungamento genico a partire da un gene ancestrale;
- ✓ CotG ha un ruolo negativo sull'assemblaggio di CotC e sulla germinazione (probabilmente come conseguenza del difetto di assemblaggio di CotC);
- ✓ Il ruolo negativo di CotG è controbilanciato dalla presenza di CotH.

I risultati descritti in questo lavoro sono stati oggetto della seguente pubblicazione: *Organization and Evolution of the cotG and cotH Genes of Bacillus subtilis*.

5.Bibliografia

- Altschul, S. F., et al.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402
- Baccigalupi, L., et al.** 2004. GerE-independent expression of *cotH* leads to CotC accumulation in the mother cell compartment during *Bacillus subtilis* sporulation. *Microbiology* **150**:3441–3449.
- Cangiano, G., et al.** 2010. Direct and indirect control of late sporulation genes by GerR of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **192**:3406–3413.
- Cutting, S., and P. B. Vander Horn.** 1990. Genetic analysis, p. 27–74. *In* C. Harwood and S. Cutting (ed.), *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
- Driks, A., S. Roels, B. Beall, C. P. Moran, Jr., and R. Losick.** 1994. Subcellular localization of proteins involved in the assembly of the spore coat of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **8**:234–244.
- Eichenberger, P., et al.** 2004. The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biol.* **2**(10):e328.

- Fani, R.** 2004. Gene duplication and gene loading, p. 67–81. *In* R. V. Miller and M. J. Day (ed.), *Microbial evolution: gene establishment, survival, and exchange*. ASM Press, Washington, DC.
- Fani, R., and M. Fondi.** 2009. Origin and evolution of metabolic pathways. *Phys. Life Rev.* **6**:23–52.
- Fani, R., P. Lio`, I. Chiarelli, and M. Bazzicalupo.** 1994. The evolution of the histidine biosynthetic genes in prokaryotes: a common ancestor for the *hisA* and *hisF* genes. *J. Mol. Evol.* **38**:489–495.
- Fani, R., M. Brilli, M. Fondi, and P. Lio`.** 2007. The role of gene fusions in the evolution of metabolic pathways: the histidine biosynthesis case. *BMC Evol. Biol.* **7**(Suppl. 2):S4.
- Fondi, M., G. Emiliani, and R. Fani.** 2009. Origin and evolution of operons and metabolic pathways. *Res. Microbiol.* **160**:502–512.
- Fondi, M., G. Emiliani, P. Lio, S. Gribaldo, and R. Fani.** 2009. The evolution of histidine biosynthesis in archaea: insights into the his genes structure and organization in LUCA. *J. Mol. Evol.* **69**:512–526.
- Fritze, D.** 2004. Taxonomy and systematics of the aerobic endospore forming bacteria: *Bacillus* and related genera, p. 17–34.

In E. Ricca, A. O. Henriques, and S. M. Cutting (ed.), Bacterial spore formers. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom.

Gao, L., and M. Lynch. 2009. Ubiquitous internal gene duplication and intron creation in eukaryotes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **106**:20818–20823.

Halberg, R., and L. Kroos. 1994. Sporulation regulatory protein SpoIIID from *Bacillus subtilis* activates and represses transcription by both mothercell-specific forms of RNA polymerase. J. Mol. Biol. **243**:425–436.

Henriques, A. O., and C. P. Moran, Jr. 2007. Structure, assembly and function of the spore surface layers. Annu. Rev. Microbiol. **61**:555–588.

Horton, R. M., H. D. Hunt, S. N. Ho. Pullen, and J. K. R. Pease. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. Gene **77**:61–68.

Ichikawa, H., R. Halberg, and L. Kroos. 1999. Negative regulation by the *Bacillus subtilis* GerE protein. J. Biol. Chem. **274**:8322–8327.

Irnov, I., C. M. Sharma, J. Vogel, and W. C. Winkler. 2010. Identification of regulatory RNAs in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. **38**:6637–6651.

- Isticato, R., A. Pelosi, M. De Felice, and E. Ricca.** 2010. CotE binds to CotC and CotU and mediates their interaction during spore coat formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **192**:949–954.
- Kim, H., et al.** 2006. The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network. *Mol. Microbiol.* **59**:487–502.
- Kimura, M.** 1980. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**:111–120.
- Krajčíková, D., M. Lukačová, D. Müllerová, S. M. Cutting, and I. Barák.** 2009. Searching for protein-protein interactions within the *Bacillus subtilis* spore coat. *J. Bacteriol.* **191**:3212–3219.
- Levin, P. A., et al.** 1993. An unusually small gene required for sporulation by *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **9**:761–771.
- McKenney, P. T., et al.** 2010. A distance-weighted interaction map reveals a previously uncharacterized layer of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Curr. Biol.* **20**:934–938.
- Mota, L. J., P. Tavares, and I. Sá-Nogueira.** 1999. Mode of action of AraR, the key regulator of L-arabinose metabolism in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **33**:476–489.

- Moxon, E. R.** 1999. Whole-genome analysis of pathogens, p. 191–204. *In* S. C. Stearns (ed.), *Evolution in health and disease*. Oxford University Press, New York, NY.
- Naclerio, G., L. Baccigalupi, R. Zilhao, M. De Felice, and E. Ricca.** 1996. *Bacillus subtilis* spore coat assembly requires *cotH* gene expression. *J. Bacteriol.* **178**:4375–4380.
- Nicholson, W. L., and P. Setlow.** 1990. Sporulation, germination and outgrowth, p. 391–450. *In* C. Harwood and S. Cutting (ed.), *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
- Ramamurthi, K. S., K. S. Clapham, and R. Losick.** 2006. Peptide anchoring spore coat assembly to the outer forespore membrane in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **62**:1547–1557.
- Ramamurthi, K. S., and R. Losick.** 2008. ATP-driven self-assembly of a morphogenetic protein in *Bacillus subtilis*. *Mol. Cell* **31**:406–414.
- Ricca, E., S. Cutting, and R. Losick.** 1992. Characterization of *bofA*, a gene involved in inter-compartmental regulation of pro-sK processing during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**:3177–3184.

- Roels, S., A. Driks, and R. Losick.** 1992. Characterization of *spoIVA*, a sporulation gene involved in coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**:575–585.
- Sacco, M., E. Ricca, R. Losick, and S. Cutting.** 1995. An additional GerEcontrolled gene encoding an abundant spore coat protein from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:372–377.
- Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–425.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Tamura, K., et al.** 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**:2731–2739. doi:10.1093/molbev/msr121.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W:improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.

- Youngman, P., J. B. Perkins, and R. Losick.** 1984. A novel method for the rapid cloning in *Escherichia coli* of *Bacillus subtilis* chromosomal DNA adjacent to Tn917 insertion. *Mol. Gen. Genet.* **195**:424–433.
- Zheng, L., W. P. Donovan, P. C. Fitz-James, and R. Losick.** 1988. Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the outer coat of the *Bacillus subtilis* endospore. *Genes Dev.* **2**:1047–1054.
- Zilhão, R., et al.** 1999. Assembly requirements and role of CotH during spore coat formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:2631–2633.
- Zilhão, R., et al.** 2004. Interactions among CotB, CotG, and CotH during assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. *J. Bacteriol.* **186**:1110–1119.